



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Odontología

Escuela Académico Profesional de Odontología

**Susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes
aislados de bolsas periodontales frente a sustancias
antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Cinthia Evilin BERROCAL MEDRANO

ASESOR

Donald RAMOS PERFECTO

Lima, Perú

2016



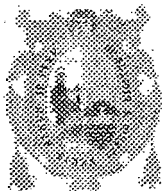
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Berrocal C. Susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Escuela Académico Profesional de Odontología; 2016.



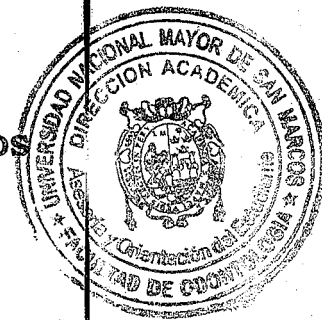
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

VICE DECANATO ACADÉMICO

UNIDAD DE ASESORÍA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE



ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el doce de diciembre del 2016, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller:

BERROCAL MEDRANO, Cinthia Evilin

CERTIFICAN :

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **SUSCEPTIBILIDAD DE BACILOS NEGRO PIGMENTANTES AISLADOS DE BOLSAS PERIODONTALES FRENTE A SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS PRODUCIDAS POR LACTOBACILLUS REUTERI** » y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demuestra un grado de aprovechamiento..... *Sobresaliente*....., siendo calificada con un promedio de: *diecinueve*....., siendo

(en letras)

(en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los doce días del mes de diciembre del dos mil dieciséis.

PRESIDENTE DEL JURADO

Mg. C.D. Andrew Alejandro Estrada

MIEMBRO

Mg. C.D. Martha Cecilia Rodríguez Vargas

MIEMBRO (ASESOR)

Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:

Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)

Criterios : Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

JURADO DE SUSTENTACIÓN

Presidente: Mg. C.D. Andrew Alejandro Estrada

Miembro: Mg. C.D. Cecilia Rodríguez Vargas

Miembro Asesor: Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto

DEDICATORIA

A Dios por guiarme y cuidarme siempre

*A mis padres Gabriel y Felicita por darme
la vida, por su confianza, por su ejemplo de perseverancia
y ser mi apoyo constante en todas las metas que me
propongo.*

*A mi hermana Carla por sus palabras de aliento y siempre
brindarme su ayuda.*

A Erick por su cariño, paciencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. C.D. Donald Ramos Perfecto, profesor de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, asesor de la presente tesis, por su apoyo continuo y el tiempo dedicado a la realización de este trabajo de investigación.

A la Mg. Blga. Elena Quillama Polo, docente de la facultad de Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien ha demostrado ser maestra por su desinteresado apoyo constante y colaboración en el manejo de bacterias ácido lácticas.

Al Mg. C.D. Andrew Alejandro Estrada, presidente de jurado por sus aportes y ayuda brindada en la realización de la investigación.

A la Mg. C.D. Martha Cecilia Rodríguez Vargas por sus aportes como miembro del jurado en la presente investigación.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su disposición y paciencia durante la ejecución del proyecto.

A mi alma mater “Universidad Nacional Mayor de San Marcos” y a la Facultad de Odontología por la educación impartida, los llevare en mi corazón en todo momento y lugar.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes (BNP) aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*, dichas bacterias son bacilos anaerobios Gram negativos, y están fuertemente relacionadas con la progresión de la Periodontitis; para lo cual se empleó el método de recubrimiento de agar.

Los microorganismos BNP fueron aisladas de muestras tomadas de bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal atendidas en la Facultad de Odontología de la UNMSM. Las cepas de *Lactobacillus reuteri* DSM17938 se obtuvo del producto comercial *Lactobacillus reuteri* Protectis (BioGaia). BNP se cultivó en agar Schaedler y luego en medio Tioglicolato + Hemina + Menadiona para la prueba de antagonismo. *Lactobacillus* se cultivó en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) y se inoculó en placas Petri de agar MRS y se dejó crecer en condiciones de microaerofilia. Se utilizó una técnica de recubrimiento de agar en donde el agar líquido (1%) con BNP se vertió sobre las placas de MRS de *Lactobacillus*. Después de una incubación en condiciones de anaerobiosis, se observó que los BNP crecieron a lo largo de la extensión de la placa Petri.

Se concluye que no existe susceptibilidad de BNP frente a las sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*.

Palabras Clave: Probiótico, *Lactobacillus*, antibacteriano, bacterias anaerobias.

SUMMARY

The aim of this study was to determinate the susceptibility of Black Pigmented Bacilli (BNP) isolated from periodontal pockets against antibacterial substances produced by *Lactobacillus reuteri*. Those periodontopathogenic bacteria are Gram negative and strict anaerobic, also they are strongly related with the progression of periodontitis. To this purpose, the study used the agar overlay technique.

BNP microorganisms were isolated from samples taken from periodontal pockets of patients with periodontal disease treated at the Faculty of Dentistry of San Marcos University. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 strains were obtained from the commercial product *Lactobacillus reuteri* Protectis (BioGaia).

BNP was grown into Schaedler agar and then in Thioglycolate + Hemin + Menadione media for the antagonism test. *Lactobacillus* was grown in Man Rogosa Sharpe (MRS) media and inoculated on petri dish of MRS agar and allowed to grow under microaerophilic conditions. An agar overlay technique was used where the liquid agar laced with BNP was poured over the *Lactobacillus* MRS plates. After further anaerobic incubation, it was observed that the BNP grew throughout the span of the petri dish including the areas where the *Lactobacillus* was growing.

It is concluded that there is no susceptibility of BNP to antibacterial substances produced by *Lactobacillus reuteri*. Further study using other know probiotics should be considered.

Keywords: Probiotic, *Lactobacillus*, antibacterial, anaerobic bacteria.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	8
II.PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
2.1. Área problema.....	10
2.2. Delimitación del problema.....	11
2.3. Formulación del problema.....	12
2.4. Objetivos.....	12
2.5. Justificación.....	13
2.6. Limitaciones.....	14
III. MARCO TEÓRICO.....	15
3.1. Antecedentes.....	15
3.2. Bases teóricas.....	21
3.3 Definición de términos.....	51
3.4. Hipótesis.....	51
3.5. Operacionalización de variables.....	51
IV. METODOLOGÍA.....	53
4.1. Tipo de investigación.....	53
4.2. Población y muestra.....	53
4.3. Procedimientos y técnica.....	54
4.4. Procesamiento de datos.....	58
4.5. Análisis de resultados.....	59
V. RESULTADOS.....	60
VI. DISCUSIÓN.....	65
VII. CONCLUSIONES.....	68
VIII. RECOMENDACIONES.....	69
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
X. ANEXOS.....	78

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que las principales afecciones bucales como caries dental y enfermedad periodontal constituyen un importante problema de salud debido a su alta prevalencia e incidencia en la salud general de la población mundial.

Entre las enfermedades periodontales se encuentra la gingivitis y la periodontitis, siendo la primera la forma más leve y la periodontitis el proceso más severo de la enfermedad periodontal.

La periodontitis afecta a los tejidos de soporte del diente (encía, cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar) y cuando progresa puede causar la destrucción de estos tejidos, para finalmente ocasionar la pérdida de la pieza dentaria. El biofilm dental es considerado el principal factor etiológico, facilitado por un pobre mantenimiento de la salud oral, predispone a cambios en la comunidad microbiana conduciendo a la aparición de la inflamación periodontal. La actual visión de la etiología considera tres factores que determinan si la enfermedad se desarrollará en un sujeto la susceptibilidad del huésped, la presencia de especies patogénicas y la reducción o ausencia de las llamadas bacterias beneficiosas.

El tratamiento convencional de la periodontitis va dirigido a la remoción y control mecánico del biofilm dental supra y subgingival. Pero la recolonización de la flora bacteriana ocurre durante las primeras semanas y el restablecimiento de una microbiota más patógena en unos meses. El uso de antibióticos o antisépticos orales o sistémicos no mejora el efecto de la terapia periodontal a largo plazo. Por

esta razón, algunos autores han empezado a centrarse en el tercer factor etiológico: la reducción y ausencia de las bacterias beneficiosas.

Los probióticos según la Organización Mundial de la Salud son definidos como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del huésped. Los efectos beneficiosos de las bacterias probióticas están bien establecidos para ciertas enfermedades gastrointestinales, alergias, eccemas e infecciones urogenitales, etc., mientras que su posible papel sobre los efectos en la salud periodontal es aún limitada.

La creciente evidencia del uso de la terapia probiótica sustituyendo bacterias patógenas por bacterias beneficiosas podría convertirse en una alternativa válida que eliminaría o disminuiría la tendencia emergente a resistencias antibióticas.

Teniendo en cuenta que los probióticos podrían ser una herramienta útil en la mejora de la condición oral y el mantenimiento de la salud en individuos con elevado riesgo de padecer enfermedad periodontal, se realiza el presente estudio con la finalidad de conocer si existe susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes (BNP) aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Área problema

El aumento de resistencias a un número cada vez más amplio de antibióticos ha llevado a los científicos a desarrollar nuevos medios para la lucha contra las enfermedades infecciosas. Por ello, el interés por los probióticos y su efecto sobre la microbiología para restaurar y mantener la salud ha adquirido un gran interés en las últimas décadas.¹

Las principales especies con actividad probiótica y terapéutica que se utilizan y que mejor se conocen son los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.¹ El campo principal de la investigación se ha centrado en el tracto gastrointestinal; sin embargo, en los últimos años, los probióticos han sido investigados también desde la perspectiva de la salud bucal.²

Los estudios de los potenciales probióticos orales se han enfocado en la prevención de la caries. También se han investigado otras posibles aplicaciones como la reducción de la microflora asociado con la halitosis y candidiasis oral. Sin embargo, son pocos los estudios disponibles con respecto al efecto de los probióticos en la salud periodontal y sus condiciones clínicas.²

En el área periodontal la aplicación de los probióticos, como un complemento al raspado y alisado radicular, podría inhibir la recolonización de microorganismos patógenos de las bolsas periodontales para lograr y mantener la salud periodontal.³

Nuevos estudios muestran que las sustancias producidas por *Lactobacillus reuteri* podría actuar de forma sinérgica con el tratamiento estándar para reducir significativamente la profundidad de sondaje de bolsas y el nivel de inserción clínico, los cuales son los dos parámetros más importantes para evaluar la gravedad de la periodontitis crónica.^{3,4}

2.2. Delimitación del área problema

El consumo de especies de probióticos ya sea a través de productos lácteos fermentados o como suplementos dietéticos (cápsulas, polvo, tabletas, goma de mascar y gotas) actúan como agentes terapéuticos. A nivel bucal, ensayos clínicos y microbiológicos han demostrado que las personas cuyas bocas están colonizadas por bacterias probióticas después de consumir dichos productos podrían presentar significativamente menor cantidad de agentes patógenos asociado a caries y enfermedad periodontal.⁴

Las enfermedades periodontales son altamente prevalentes, por ejemplo la periodontitis crónica se inicia y es mantenida por la presencia del biofilm subgingival, el cual aloja diversos microorganismos como los bacilos negro pigmentantes (BNP) encargados de desencadenar la destrucción del tejido periodontal.⁵

L. reuteri (*L. reuteri*) es capaz de producir sustancias como reuterina y reuterociclina, que son antimicrobianos de amplio espectro resistentes a enzimas proteolíticas y lipolíticas.⁶ Investigaciones *in vivo* e *in vitro* muestran que *L. reuteri* tiene actividad inhibitoria contra *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.*

actinomycetemcomitans), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*)³.

2.3. Formulación del problema

¿Presentan susceptibilidad los bacilos negro pigmentantes aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*?

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo general

- Determinar la susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*.

2.4.2. Objetivos específicos

- Comparar la susceptibilidad de bacilos negro pigmentantes frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri* y la cepa referencial *Lactobacillus plantarum*.
- Comparar la susceptibilidad de la cepa indicadora *Lactobacillus fermentum* frente a sustancias producidas por *Lactobacillus reuteri*.

2.5. Justificación

La enfermedad periodontal es la segunda afección bucal con mayor prevalencia e incidencia en el Perú.⁷ De acuerdo, al creciente número de investigaciones y publicaciones que relacionan la enfermedad periodontal, principalmente la periodontitis, como un factor de riesgo para diversas alteraciones sistémicas como pérdida dentaria, diabetes, aterosclerosis, enfermedades crónicas del riñón, parto prematuro y enfermedad cardiovascular.⁸ Por ello la necesidad de establecer una buena salud periodontal para el logro de una buena salud sistémica es de suma importancia y los probióticos son opciones prometedoras y seguras.

Por otro lado, existe un esfuerzo por reducir el uso de antibióticos debido al creciente desarrollo de resistencia bacteriana a estos, la Organización Mundial de la Salud respalda, en lo posible, el uso de probióticos como una terapia de interferencia microbiana, apoyando el uso de microorganismos no patógenos para eliminar los nocivos.

Actualmente estudios clínicos sobre el uso de tabletas, comprimidos y gomas de mascar a base del probiótico *Lactobacillus reuteri* refieren que estos podrían ejercer un efecto protector contra patógenos periodontales.

El presente trabajo pretenderá determinar la susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*.

2.6 Limitaciones

- No existen investigaciones científicas en nuestro país referente al beneficio de bacterias probióticas sobre todo de *Lactobacillus* en el campo de la odontología.
- La obtención de la cepa comercial pura de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730.
- El trabajo con bacterias anaerobias por el presupuesto que ameritan los medios de cultivo y/o aparatos para su estudio.
- Las condiciones de ser un estudio de tipo experimental, *in vitro*, dado que los microorganismos se desarrollarán en condiciones ambientales simuladas en el laboratorio utilizando los parámetros necesarios para su desarrollo ideal, a diferencia de los demás factores que puedan influir en las condiciones *in vivo*.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes

Baca M. (2014). Evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de *L. reuteri* sobre bacterias patógenas que intervienen en la formación de la caries dental: *S. mutans*, *S. gordonii*, y la enfermedad periodontal: *A. Naeslundii* y *T. forsythia*. Para evaluar la acción antimicrobiana se empleó el método de Kirby Bauer. Clorhexidina al 0,12% fue el control positivo. *L. reuteri* demostró tener efecto inhibitorio frente a *S. mutans*, seguido de *T. forsythia* y *S. gordonii*, y un efecto menos significativo contra *A. naeslundii*. Con respecto al efecto mostrado por *L. reuteri* en los patógenos, se podría considerar su uso como un posible alimento funcional en la prevención o tratamiento de enfermedades orales.⁹

Teughles W. (2013). Realizó un ensayo clínico controlado con placebo para evaluar los efectos del *L. reuteri* contenido en pastillas probióticas como complemento a raspado y alisado radicular (SRP), en treinta pacientes con periodontitis crónica supervisados clínica y microbiológicamente al inicio del estudio, 3, 6, 9 y 12 semanas. Los pacientes fueron asignados en 2 grupos: un grupo de prueba (SRP + probiótico, n = 15) y un grupo control (SRP + placebo, n = 15). Las pastillas se utilizaron dos veces al día durante 12 semanas. Se obtuvo como resultado en la semana 12 que todos los parámetros clínicos se redujeron significativamente en ambos grupos, se observó una mayor reducción de *P. gingivalis* en el grupo SRP + probiótico. Se concluyó que la administración oral de pastillas de *L. reuteri* podría ser un complemento útil a SRP en la periodontitis crónica.¹⁰

Hallstrom H. (2013). Realizó un estudio para evaluar si la administración oral de bacterias probióticas en 18 personas podría influir en la respuesta inflamatoria y en la composición de la placa supragingival en un modelo de gingivitis experimental. Se utilizó la superficie bucal de las primeras molares como sitios experimentales, para ello se usó un protector bucal de primer premolar a segunda molar durante el cepillado, previniendo la limpieza durante 3 semanas para la acumulación de placa. Se tomó muestras de fluido crevicular al inicio, durante y después del estudio. Los sujetos fueron asignados al azar para recibir tabletas que contienen *L. reuteri* o placebo dos veces al día por tres semanas. Se concluyó que la ingesta diaria de pastillas probióticas parece no afectar significativamente la acumulación de placa, la reacción inflamatoria o la composición de la biopelícula durante la gingivitis experimental.¹¹

Szkaradkiewicz A. (2013). Realizó un estudio para evaluar la respuesta de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-17) en 38 pacientes con periodontitis crónica administrados por vía oral con una cepa probiótica de *L. reuteri*. (Grupo 1) 24 pacientes en los cuales se llevó a cabo el tratamiento con tabletas probióticas que contienen la cepa de *L. reuteri* (Prodentis). (Grupo 2) 14 pacientes, no se aplicó ningún tratamiento con tabletas probióticas. De todos los pacientes se tomó muestras del fluido crevicular gingival de todas las bolsas periodontales. Después de completar la terapia con tabletas probióticas, 18 (75 %) de los pacientes del grupo 1 manifestaron una disminución significativa en los niveles de citoquinas proinflamatorias estudiados (TNF- α , IL-1 β e IL-17). En paralelo, se detectó una mejora de los parámetros clínicos (índice de sangrado, profundidad de sondaje periodontal y nivel de inserción). En los niveles de estudio de las personas del Grupo 2, las citoquinas proinflamatorias y los índices clínicos fueron significativamente más altos que en el Grupo 1. Los resultados indicaron que la aplicación de tratamiento oral con comprimidos que contienen *L.*

reuteri podría inducir una reducción significativa de la respuesta de citoquinas proinflamatorias y la mejora de los parámetros clínicos.¹²

Vicario M. (2013). Realizó este estudio para evaluar el efecto clínico de la administración de *L. reuteri* como agente probiótico en el tratamiento de la periodontitis crónica inicial-moderada y también evaluó el factor "cumplimiento" del paciente y observó los posibles efectos secundarios del agente probiótico. Veinte sujetos sistémicamente sanos, no fumadores con periodontitis crónica fueron inscritos en este ensayo doble ciego de 1 mes, controlado con placebo. Los sujetos fueron asignados al azar para recibir tabletas que contienen *L. reuteri* Prodentis o placebo una vez al día durante 30 días. Los parámetros clínicos se recogieron al inicio del estudio y 30 días post- tratamiento. Se obtuvo como resultado que los parámetros clínicos periodontales mejoraron en el grupo de prueba, mientras que el grupo control no mostró ningún cambio estadísticamente significativo en parámetros periodontales. Se concluyó que la administración oral de *L. reuteri* podría mejorar en corto plazo los resultados clínicos en pacientes no fumadores con periodontitis crónica.¹³

Keller M. y Col. (2012). Realizó un estudio para evaluar el efecto de las gomas de mascar probióticas en el mal aliento. Participaron veinticinco jóvenes adultos sanos con autoreporte de mal aliento por las mañanas. Los sujetos fueron instruidos para masticar un chicle en la mañana y otra por la noche, conteniendo ambas dos cepas de lactobacilos probióticos (*L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289) o placebo. Las medidas de los resultados fueron (i) puntuaciones organolépticas (0-5), (ii) la concentración de compuestos volátiles sulfurados (CVS) y (iii) concentración de CVS después de un enjuague con cisteína. Se hicieron registros al inicio del estudio y después de cada período de intervención. Se concluyó que las gomas probióticas pueden tener algún efecto

beneficioso sobre el mal aliento evaluado por las puntuaciones organolépticas. Los resultados indican que la goma probiótica puede afectar a las bacterias que producen compuestos malolientes distintos de CVS.¹⁴

Samot J. (2012). Evaluó el potencial probiótico *in vitro* de lactobacilos autóctonos de la cavidad oral. Para esto 66 cepas fueron seleccionadas para la actividad antibacteriana frente a dos cepas cariogénicas (*S. mutans* y *A. viscosus*) y dos cepas periodontopatogénicas (*F. nucleatum* y *P. gingivalis*). Se utilizó la técnica doble capa de agar. Todas las cepas inhibieron *S. mutans* y *A. viscosus*, solo una cepa probiótica no inhibió *F. nucleatum* y 52 cepas inhibieron significativamente *P. gingivalis*.¹⁵

Kang M. (2011). Realizó un estudio *in vitro* para evaluar el efecto de tres cepas de *Lactobacillus reuteri* (KCTC 3594, KCTC 3678 y KCTC 3679) sobre las cepas bacterianas *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 33384), *F. nucleatum* (ATCC 10953), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *T. forsythia* (ATCC 430379) y sobre la formación de biofilm de *S. mutans*. Los resultados mostraron efectos inhibitorios significativos de las cepas de *Lactobacillus reuteri* contra el crecimiento de las bacterias periodontopatogénicas y la formación de biofilm de *S. mutans*. La actividad antibacteriana de *L. reuteri* fue atribuido a la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.¹⁶

Teanpaisan R. (2011). Realizó este estudio para evaluar el efecto inhibitorio de 357 cepas de *Lactobacillus* aisladas de la cavidad oral que comprenden 10 especies *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. mucosae*, *L. oris*, *L. plantarum* y *L. vaginalis*, frente a patógenos relacionados a caries dental *S. mutans*, *S. sobrinus* así como patógenos periodontales *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Los resultados

mostraron que la mayoría de lactobacilos fue capaz de inhibir el crecimiento de patógenos relacionados a caries dental y periodontitis. El efecto inhibitorio más significativo fue asociado a *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. salivarius*. Los resultados de este estudio indicaron que *Lactobacillus* puede ser de beneficio como probiótico para la prevención de enfermedades orales.¹⁷

Vivekananda M. (2010). Evaluó los efectos del *L. reuteri* (Prodentis) solo y en combinación con el raspado y alisado radicular (SRP) en 30 pacientes con periodontitis crónica. El período de estudio fue de 42 días. El diseño 'Boca Split' fue utilizado para el SRP, el cual se realizó en el día 0; dos cuadrantes (ya sea derecha o izquierda) se trataron con SRP mientras que los dos cuadrantes restantes se dejaron sin tratar. Pastillas de *L. reuteri* y de placebo fueron tomadas dos veces al día desde el día 21 al día 42. Se evaluó los parámetros clínicos, niveles microbiológicos de los patógenos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Las evaluaciones se realizaron en el día 0 antes del tratamiento SRP, en el día 21 antes de la administración de las pastillas, y en el día 42. Se obtuvo como resultado en el día 42 la reducción de los parámetros clínicos y su clasificación según el tipo de tratamiento: SRP + Prodentis fue mayor que Prodentis solo y este a su vez mayor que SRP + placebo y placebo solo. Se concluyó que el presente ensayo controlado confirma la inhibición de la placa, los efectos antiinflamatorios y antimicrobianos de *L. reuteri*¹⁸

Twetman S. (2009). Evaluó el efecto de una goma de mascar probiótica en la inflamación gingival y los niveles de mediadores inflamatorios en el fluido crevicular gingival (GCF) de 42 adultos, se agrupó en 3 grupos: Grupo A/P (goma activa y goma placebo), Grupo A/A (dos gommas activas), y el Grupo P/P (dos gommas placebo). Las gommas contenían cepas de *L. reuteri* y se masticaron durante 10 minutos por 2 semanas. Sangrado al sondaje (BOP) y muestras de

GCF se realizaron al inicio del estudio y después de 1, 2 y 4 semana, se determinaron los niveles de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10. Como resultados BOP mejoró y el volumen de GCF se redujo en todos los grupos. Los niveles de TNF- α e IL-8 se redujeron significativamente en el Grupo A/A en comparación con el valor inicial. Se concluyó que la reducción de las citoquinas pro-inflamatorias en GCF puede ser prueba de principio para el enfoque probiótico para combatir la inflamación en la cavidad oral.¹⁹

Hedberg M. (2009). Evaluó si las cepas de *L. reuteri*, *in vitro*, inhibía el crecimiento de patógenos periodontales. *L. reuteri* produce una bacteriocina, reuterina, en presencia de glicerol. Placas de agar sangre Brucella con/sin glicerol, se sembraron con inóculos estandarizados de *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, y *A. actinomycetemcomitans*. *L. reuteri* ATCC 55730 y *L. reuteri* PTA 5289 se cultivaron en caldo MRS. Se empleó el método de difusión en disco. Como resultado se obtuvo que en las placas de agar sangre Brucella sembradas con patógenos periodontales, no se observó zonas de inhibición alrededor de los discos de papel. Cuando se añadió glicerol al agar, zonas de 26 a 118 mm aparecieron. Se concluyó que ambas cepas de *L. reuteri* inhibieron fuertemente el crecimiento de las bacterias asociadas a periodontitis en presencia de glicerol. La actividad inhibidora de *L. reuteri* PTA 5289 fue mayor que *L. reuteri* ATCC 55730.²⁰

Mayanagui G. (2009). Realizó este estudio para evaluar si la administración oral de lactobacilos podría alterar la población bacteriana de placa supra y sub gingival en pacientes con periodontitis. Un total de 66 personas fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos para recibir los lactobacilos o placebo durante 8 semanas. El grupo de prueba recibió *L.*

salivarius WB21 y xilitol en tabletas, el grupo control placebo con xilitol. Las muestras de placa se recogieron al inicio del estudio, cuarta y octava semana. Se observó que la cantidad de cinco bacterias periodontopatógenas seleccionadas en el grupo de prueba se redujo significativamente en la placa subgingival tomada en la cuarta semana. Se concluyó que la administración oral de Lactobacilos redujo la cantidad de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*.²¹

Koll P. (2008). Realizó un estudio para caracterizar *Lactobacillus* orales por sus propiedades probióticas. Para ello, aislaron 67 lactobacilos de muestras subgingivales y salivales de seres humanos sanos para evaluar su actividad antibacteriana frente a patógenos orales. Todas las cepas de lactobacilos fueron identificadas. Las cepas de *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. salivarius* y *L. rhamnosus* suprimieron el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *S. mutans*. Los resultados sugieren que ciertos lactobacilos orales podrían ser utilizados como probióticos para la salud oral.²²

3.2 BASES TEÓRICAS

3.2.1 Probióticos

3.2.1.1 Historia y Concepto

El término probiótico (etimológicamente deriva del latín pro, “a favor de”, y del griego bios, “vida”) que significa “a favor de la vida”, actualmente se utiliza para designar a las bacterias que tienen efectos beneficiosos en la salud, tanto de los seres humanos como de los animales.

La creencia de que ciertas bacterias puedan influenciar en la salud data de principios del siglo XX, cuando el premio Nobel ruso Elie Metchnikoff (1907) reportó que la población búlgara vivía más años que ciudadanos de otras naciones y supuso que se debía al consumo de productos lácteos fermentados que contenían bacterias capaces de competir con los microorganismos que eran dañinos para la salud. El estudio de estas bacterias permitió que más tarde se introdujeran en la producción comercial de productos ácido-lácteos en toda Europa.²³

Directamente con estos productos surge el término “probiótico” en el año 1965, cuando Lilly y Stilwell lo utilizaron para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro, en contraposición al término antibiótico. Parker (1974) fue el primero en usar el término “probiótico” de acuerdo con el sentido que hoy conocemos “organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal”.²⁴ Desde entonces se han propuesto diferentes definiciones pero actualmente el término “probiótico” utilizado es el definido por la FAO/WHO (The Food Agricultural/ World Health Organization) como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, en la comida o como complemento alimenticio, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped, mejorando el equilibrio microbiano del tracto intestinal.²⁴

3.2.1.2 Características de los probióticos

Los probióticos deben ser seguros, inocuos, resistentes a la acidez gástrica y a las secreciones pancreáticas, capaces de adherirse a las células epiteliales y de inhibir la adhesión de microorganismos patógenos, tener actividad antimicrobiana,

sensibilidad a los antibióticos, viabilidad alimentaria, proceder de cepas humanas y mostrar eficacia en ensayos clínicos.²⁵

3.2.1.3 Mecanismo de acción

El estudio de los mecanismos de acción que permite explicar los posibles efectos beneficiosos de los probióticos sobre la salud es uno de los aspectos más dinámicos en la investigación sobre estos microorganismos. Sin embargo, debe subrayarse el carácter multifactorial de estos mecanismos de acción ya que no todos los probióticos emplean los mismos mecanismos para ejercer un beneficio en el hospedador, lo que acentúa la importancia de documentar científicamente los beneficios que se propongan para cada cepa probiótica.

No obstante, entre los mecanismos más significativos que se han propuesto destaca (1) liberan componentes antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, además, la acumulación de tales metabolitos puede reducir el pH del medio ambiente inhibiendo el crecimiento de organismos patógenos, (2) compiten con las bacterias patógenas por los nutrientes o por los sitios de adhesión y (3) modulan la respuesta inmune no específica y específica del huésped.²³

3.2.1.4 Clasificación de los probióticos

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias ácido-lácticas que agrupan una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies (Cuadro 1). Las bacterias probióticas más comúnmente usadas y estudiadas son del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.^{23, 25}

Cuadro 1. Microorganismos usados como probióticos

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. fermentum</i> .
<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. adolescentis</i>
<i>Lactococcus spp.</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. diacetylactis</i>
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. lactis</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
<i>Bacillus spp.</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Otras especies</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Leuconostoc spp.</i>

Fuente. Amores R. Probióticos. Rev Esp Quimioterap 2004, 17 (2) pag 133

3.2.1.4.1 Género *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son las principales especies utilizadas con actividad probiótica y terapéutica, son bacterias Gram positivas, se caracterizan por presentar células en forma de bacilos largos o cortos, generalmente son no móviles, no esporulados, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa negativa y producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos. La temperatura óptima de crecimiento de los lactobacilos está entre 30 - 40 °C. ²⁶

La producción de ácido láctico hace que su ambiente sea ácido, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno. Se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos, productos lácteos y jugos vegetales fermentados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales.²⁶

Los lactobacilos están agrupados en homofermentativas o heterofermentativas basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentativas producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis (Embden-Meyerhof). Las heterofermentativas convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa (PKP), produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como ácido acético, etanol y CO₂.²⁶

3.2.1.4.1.1 *Lactobacillus reuteri*

3.2.1.4.1.1.1. Generalidades

Lactobacillus reuteri fue descrito originalmente por el microbiólogo alemán Gerhard Reuter en la década de 1960, como un biotipo de *L. fermentum* (biotipo II). En 1980, Kandler y col. identificaron a *L. reuteri* como una especie distinta basándose en las características fenotípicas y genéticas, propusieron que sea una nueva especie de lactobacilo heterofermentativo. Ellos escogieron el nombre de “reuteri” en homenaje a su descubridor Gerhard Reuter.²⁷

L. reuteri es un bacilo no formadora de espora, Gram-positivo, no móvil, anaerobio facultativo. La temperatura de crecimiento óptimo es de 37-42°C y el pH óptimo es de 6.5. Las cepas de *L. reuteri* necesitan de un requerimiento nutricional complejo carbohidratos fermentables, aminoácidos, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas.²⁷

Esta bacteria es considerada como uno de los pocos lactobacilos autóctonos en el hombre.²⁸ Esta bacteria ha sido aislada directamente del tracto gastrointestinal o heces de seres humanos y animales. Estudios han demostrado que administrado por vía oral, también resiste y sobrevive a las sales biliares, ácidos gástricos a través del estómago e intestino superior, se unen a la mucosa intestinal y a las células epiteliales, y colonizan el intestino del huésped.²⁷

L. reuteri pertenece al grupo de lactobacilos heterofermentativos y utiliza la vía fosfocetolasa para la degradación metabólica de carbohidratos fermentables.²⁹ Esta vía puede fermentar solo glucosa y producir lactato, etanol y CO₂ como productos finales; sin embargo, el crecimiento en glucosa es limitado debido a un desequilibrio redox.^{27, 29}

Una característica esencial de *L. reuteri* es su capacidad para utilizar glicerol. *L. reuteri* toma la vía PKP para producir lactato, paralelo a la formación de lactato, glicerol compite exitosamente contra acetilfosfato como un aceptor de hidrógeno terminal para reciclar NAD⁺ y esto resulta en la liberación de acetilfosfato altamente energético que a continuación es canalizada en la reacción acetato de quinasa para más ATP. La adición de glicerol como un sustrato restaura el equilibrio redox permitiendo una mayor generación de ATP, mayor producción de acetato/ menos etanol y en última instancia se logra una mayor tasa de crecimiento y formación de biomasa.^{27, 30}

Después del metabolismo del glicerol una serie de productos finales como ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos orgánicos son producidos. Entre estos, reuterina o 3-hidroxypropionaldehído (3-HPA) ha atraído la mayor atención y se ha encontrado que es una sustancia antimicrobiana potente.^{27, 28}

Reuterina o 3-HPA es un compuesto intermediario producido durante el metabolismo anaeróbico del glicerol, donde glicerol es primero deshidratado por una coenzima glicerol deshidratasa dependiente de cobalamina (B12) para formar 3-HPA, desafortunadamente 3-HPA es un intermediario intracelular que no se acumula por ello una cantidad parcial de este compuesto es reducido a 1,3-propanodiol, una oxidoreductasa dependiente de NAD⁺ es responsable de esta reducción. ^{27, 30}

3.2.1.4.1.1.2. Principales antimicrobianos

Lactobacillus reuteri produce acetato, lactato, y una variedad de otros ácidos grasos de cadena corta a lo largo de la vía del metabolismo heterofermentativo. Si bien es cierto que los ácidos contribuyen en parte a la actividad antimicrobiana global, diversos estudios han puesto énfasis en la producción *in vitro* de reuterina.

Reuterina es un compuesto de bajo peso molecular, soluble en agua, resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas, estable a un amplio rango de pH capaz de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos.²⁷

La reuterina es producida y excretada por células en reposo bajo condiciones de anaerobiosis pH y temperatura presentes en el tracto gastrointestinal. La actividad

biológica de la reuterina se evaluó mediante ensayos de MIC (Concentración mínima inhibitoria), determinándose que concentraciones en el rango de 15-30 µg/ml inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas, Gram positivas, levaduras, hongos y protozoarios mientras que concentraciones mayores a 4 o 5 veces más son requeridas para matar bacterias ácido lácticas incluida *L. reuteri*.³¹

Varios estudios han determinado que la producción de reuterina relativamente pura puede ser obtenido por el método de fermentación en dos pasos, primero mediante condiciones óptimas de crecimiento se obtiene biomasa, luego estas cantidades considerables de células en reposo de *L. reuteri* pasan a un proceso de fermentación con suplementación de glicerol.^{32, 33, 34}

Los factores como temperatura, pH, tiempo, biomasa, edad celular, concentración de glicerol que aumentan la acumulación de 3-HPA podrían no tener el mismo impacto sobre su estabilidad³⁴. Además, la cofermentación de glucosa/glicerol en *L. reuteri*, debe estar en una relación molar no más de 0.33, determinando que un exceso de glucosa puede tener un efecto represor sobre la producción de reuterina reduciéndolo adicionalmente a 1,3-propanodiol³⁵. Por lo tanto, el impacto de la glucosa en la fermentación del glicerol es significativo, el glicerol como un hidrato de carbono no fermentable tiene que ser acoplado con una fuente de carbono fermentable para producir reuterina.³⁵

Se ha encontrado que *L. reuteri* produce otra sustancia antimicrobiana de bajo peso molecular llamada reuterociclina (ácido tetrámico). Este compuesto es bacteriostático o bactericida a bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram negativas y levaduras son resistentes debido a las propiedades de sus membranas externas.²⁷

Varios estudios han demostrado que la cepa de *L. reuteri* (ATCC 55730 y su cepa hija DSM 17938) tienen propiedades probióticas, es considerada como una especie verdadera y autóctona de *Lactobacillus* en el hombre.²⁸ Esta cepa utiliza las dos vías glucolíticas, la vía fosfoacetolasa (PKP) como ruta principal y la vía Embden-Meyerhof como ruta alternativa. Una combinación de diferentes mecanismos, tales como la excreción de ácido láctico, acético y ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y sustancias antimicrobianas como reuterina hace que la especie sea un inhibidor del crecimiento con éxito de microorganismos patógenos.^{6,27}

3.2.1.4.1.1.3. Colonización

El mecanismo de colonización de *L. reuteri* como probiótico ha sido estudiado inicialmente en el tracto gastrointestinal. Para que las bacterias sean capaces de colonizar este ambiente de flujo abierto, la adhesión a la mucosa es un requisito previo. Las células epiteliales del intestino están cubiertas por una capa protectora de moco (mezcla compleja de glucoproteínas y glucolípidos) siendo la mucina el componente principal. Las bacterias que colonizan la mucosa se pueden encontrar tanto en la capa de moco como en adhesión con las células epiteliales.³⁶

La mucina, componente principal de la mucosidad, secretada por las células caliciformes ayudará a *L. reuteri* a adherirse y replicarse en la capa de mucus sobre las células epiteliales. El gen correspondiente a las proteínas de unión al mucus (Mub) ha sido identificado en muchas cepas de *L. reuteri* y su presencia se correlaciona en gran medida con la adhesión de mucus *in vitro*. Además, también se ha encontrado en *L. reuteri* una proteína de unión a colágeno (CnBP) que participa en la adhesión a epitelio y/o mucus junto con enzimas extracelulares

glucosiltransferasa (GTFs) e inulosucrasa (Inu) que sintetizan diferentes homopolisacáridos que contribuyen a la agregación celular y a la formación de biofilm *in vitro* en condiciones ácidas.³⁷

Los polisacáridos extracelulares (EPS) contribuyen a la formación de biofilm principalmente en la adhesión inicial y al firme anclaje de las bacterias a superficies sólidas. Los EPS se dividen en homopolisacáridos y heteropolisacáridos. Muchas cepas de *L. reuteri* producen homopolisacáridos y oligosacáridos compuestos por restos de glucosa (glucanos y gluco-oligosacáridos) o residuos de fructosa (fructanos y fructo-oligosacáridos). Estos compuestos se sintetizan a partir de sacarosa por la acción única de enzimas extracelulares como glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, respectivamente. Los glucanos producidos por *L. reuteri* también pueden actuar como prebióticos estimulando el crecimiento de cepas probióticas o cepas beneficiosas en el tracto gastrointestinal.³⁷

Las cepas de *L. reuteri* producen glucanos y fructanos de diferentes tipos de enlace y expresan los genes *GtfA* e *inu* que codifican a glucosiltransferasa (GTFA) e inulosucrasa respectivamente. El gen reuteransacarasa (*Gtfo*) está presente en *L. reuteri* ATCC 55730, el homopolisacárido reuteran es producido por la enzima reuteransacarasa (GTFO). Por otro lado, GTFO puede contribuir a la formación de polímeros y la colonización en las superficies orales.^{27, 38}

Algunas cepas de *L. reuteri* poseen proteínas de unión de glucano que contribuyen a la coagregación, a pesar de que no producen glucano. Inu es una proteína de unión glucano y un receptor para el glucano producido por GTFA.²⁷

El biofilm de *Lactobacillus reuteri* produce factores antimicrobianos y anti-inflamatorios. *L. reuteri* secreta factores que suprimen la producción de TNF por las células monocitoidales activados con lipopolisacáridos. *L. reuteri* también produce mayores cantidades de reuterina cuando son cultivadas como células planctónicas o biofilms.³⁹

3.2.1.4.1.1.4. Seguridad

La seguridad (definida como ausencia de reacciones adversas clínicas, tales como náuseas, características de las heces, vómitos, flatulencia o síntomas abdominales) de *L. reuteri* ha sido documentada en varios ensayos clínicos en humanos, adultos sanos, niños, bebés y recién nacidos, así como en voluntarios seropositivos inmunosuprimidos.^{6, 27} Varios estudios realizados concluyen que una dosis de 10^8 UFC/día es bien tolerado, seguro y eficaz en el hombre.²⁷

L. reuteri ATCC 55730, se ha demostrado que posee una serie de resistencias a antibióticos intrínsecos. Esto hace, sin embargo, llevar a resistencias inusuales específicas a la tetraciclina y lincosamidas, así como una resistencia a β -lactama que aparece en aproximadamente la mitad de los miembros de estas especies. Los lactobacilos añadidos a la cadena alimentaria no deben llevar genes antibióticos transferibles de acuerdo con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. En consecuencia, la eliminación de los dos plásmidos de resistencia contra la tetraciclina y lincomicina en el probiótico comercial de la cepa *L. reuteri* ATCC 55730, resultan en la cepa hija *L. reuteri* DSM 17938 sin perder ninguna característica probiótica.²⁷

3.2.1.5 Administración de los Probióticos

Los agentes probióticos han sido clasificados dentro del grupo de los alimentos funcionales, estos son aquellos que, en forma natural o procesada, contienen componentes que ejercen beneficios para el organismo que van más allá de la función nutritiva.¹

Los probióticos se ofrecen en productos en cuatro formas básicas: (1) como un cultivo concentrado añadido a una bebida o a un alimento, (2) inoculado en fibras prebióticas (ingredientes no digestibles que se encuentran en los alimentos que favorecen el crecimiento de los probióticos), (3) Inoculado en alimentos lácteos (productos de consumo diario como leche, yogurt y queso), (4) concentrado y envasado como suplementos dietéticos (productos que no son de consumo diario como cápsulas, polvo, tabletas, gomas de mascar y gotas).^{1,}

3.2.1.6 Efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana

3.2.1.6.1. Efectos sistémicos

Los probióticos han sido ampliamente estudiados en trastornos gastrointestinales como diarreas de distintas etiologías, intolerancia a la lactosa, estreñimiento, enfermedades inflamatorias del intestino. Otros beneficios que siguen demostrándose aunque con menor evidencia científica, es el caso de la potenciación del sistema inmune, en la disminución del riesgo de padecer cáncer de colon, reducción en los niveles de colesterol, prevención y tratamiento de reacciones alérgicas, infecciones urogenitales.^{40, 41}

3.2.1.6.2. Efectos en la cavidad oral

Debido a la complejidad de la microbiota oral y a la dificultad del tratamiento de los biofilms dentales, el uso de los probióticos ha pasado de utilizarse en diferentes campos de la salud general a diferentes campos de la salud oral, tales como: caries dental, candidiasis, halitosis y enfermedad periodontal.^{2, 42, 43} Los probióticos deben poseer la capacidad de adhesión sobre las superficies orales y formar parte del biofilm, actuando como una capa protectora de los tejidos.

La **caries** es una enfermedad multifactorial de origen bacteriano que afecta los tejidos duros de las piezas dentarias, se caracteriza por la desmineralización ácida del esmalte y su consecuente destrucción, este proceso se desarrolla en forma permanente, continua e irreversible que avanza desde el exterior hacia el interior hasta alcanzar la pulpa dental.⁴⁴

Los *Streptococcus* del grupo *mutans* es el principal agente bacteriano implicado en el desarrollo de las caries dentales; por ello se cree que inhibiendo su colonización en la superficie del diente se previene la formación del biofilm y el desarrollo de caries.² Para que un probiótico sea capaz de prevenir o limitar el proceso de la caries, debe adherirse a las superficies dentales e integrarse en las comunidades bacterianas para competir y antagonizar con las bacterias patógenas previniendo de esta forma su proliferación, también debe neutralizar las condiciones ácidas, y en la medida de lo posible fomentar la remineralización.⁴⁵

El efecto de los probióticos en la inhibición de *Streptococcus mutans* ha sido evaluado en varios estudios experimentales *in vitro*^{46, 47} e *in vivo*. En ese sentido, Nase y cols fueron los primeros en comprobar si una cepa de lactobacilos, era capaz de inhibir la caries, en un ensayo clínico en 596 niños a doble ciego

observaron que la administración de *L. rhamnosus* GG reducía el riesgo y desarrollo de caries. Varios estudios han demostrado que los probióticos en diferentes productos pueden reducir los niveles de *S. mutans* en saliva y placa dental.^{42, 44, 45, 48}

Nikawa y cols examinaron los efectos de un yogur con la cepa probiótica *L. reuteri* sobre la cantidad oral de *Streptococcus mutans*, observaron que el consumo diario por dos semanas del yogurt probiótico reducía significativamente los niveles de *S. mutans* en saliva.^{42, 48}

Caglar y cols en sus investigaciones evaluaron el efecto de la bacteria probiótica *Lactobacillus reuteri* sobre los niveles de *Streptococcus mutans* salival y *Lactobacillus* administrados en forma de polvos disueltos en un líquido, comprimidos, gomas de mascar, pastillas, observaron una reducción estadísticamente significativa de los niveles de *Streptococcus mutans* después de la ingesta de la bacteria probiótica mediante cualquier vehículo de administración, en contraste con los controles placebo mas no se observaron cambios en los niveles de *Lactobacillus* orales.^{42,48}

Candidiasis es una infección por hongos levadiruformes de las membranas mucosas que recubren la boca y la lengua. *Candida albicans* es la especie más común de las infecciones fúngicas orofaríngeas y orales frecuente en personas de edad avanzada y pacientes inmunodeprimidos. Factores que predisponen al crecimiento excesivo de hongos podrían ser pautas prolongadas de antibióticos de amplio espectro, medicamentos inmunosupresores, disfunciones endocrinas, deficiencias nutricionales, xerostomía y mala higiene oral.⁴⁸

El efecto de los probióticos en la inhibición de *Candida* oral ha sido evaluado en estudios *in vitro*⁴⁶ e *in vivo*^{49, 50}. Hatakka y cols fueron los primeros en realizar un estudio controlado, randomizado a doble ciego, para comprobar el efecto de probióticos sobre *Candida* oral, donde registraron una reducción de la prevalencia de *C. albicans* tras el consumo de queso con *L. rhamnosus* GG, y *Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii* de 16 semanas en 276 pacientes de edad avanzada.⁴⁹

Duo Li y cols realizaron un estudio clínico con 65 pacientes asignados al azar para recibir agentes antifúngicos orales solo y probióticos locales (mezcla de *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Los resultados concluyeron que en comparación con las terapias antifúngicas convencionales para la candidiasis oral, la inclusión de los probióticos administrados a nivel local ayudó a mejorar ciertas condiciones clínicas y la reducción de la prevalencia de *Candida* spp.⁵⁰

La *halitosis* no está considerada como una enfermedad pero es uno de los motivos de consulta más habituales por parte del paciente, el origen de este mal olor radica en los componentes volátiles sulfurosos que derivan de la degradación de bacterias que residen en la cavidad oral y en especial en el dorso de la lengua. Otros factores que predisponen al mal olor oral: la enfermedad periodontal, caries profundas, restauraciones inadecuadas y lesiones endodónticas. Dado que los microorganismos, especialmente los de la lengua, son la principal causa de la *halitosis*, el tratamiento actual está enfocado en el uso químico o antibacteriano de sustancias para reducir el número de estas bacterias, aunque esta reducción es solo temporal ya que la *halitosis* suele presentarse de inmediato al suspender estas terapias. Para prevenir la recolonización de organismos causantes del mal

olor, los probióticos podrían tener una aplicación potencial como coadyuvante en el tratamiento y prevención de la halitosis.^{14, 48}

El peróxido de hidrogeno reduce significativamente las concentraciones de gas azufre *in vivo*. La cepa probiótica (*Weisella cibaria*) posee la capacidad de inhibir la producción de CVS tanto *in vivo* como en condiciones *in vitro*. Kang y cols observaron una disminución en los niveles de CVS producidos por *Fusobacterium nucleatum*, tras la ingesta de *Weisella cibaria*; dicho efecto podría deberse a la producción de peróxido de hidrogeno generado por *Weisella cibaria*.

Burton y cols realizaron un ensayo controlado, randomizado con placebo en pacientes con halitosis para evaluar la eficacia de pastillas de *S. salivarius*. Los resultados mostraron reducción significativa en los niveles de CVS en el grupo probiótico.⁴³

3.2.2. Enfermedad Periodontal

El periodonto es el conjunto de estructuras tisulares que constituyen una unidad de desarrollo, biológica y funcional. Constituido por el aparato de sostén que alberga al diente en el alvéolo y comprende cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar. Estas estructuras están recubiertas por una porción de la mucosa oral denominada mucosa gingival o encía.⁵¹

El término enfermedad periodontal engloba un grupo de enfermedades infecciosas que alteran las estructuras del periodonto que dan como resultado una inflamación de la encía y una pérdida progresiva del tejido óseo que ocurre con el tiempo, producido por diversos microorganismos patógenos que colonizan el área supra y subgingival.⁵²

3.2.2.1 Clasificación de la enfermedad periodontal

La Asociación Americana de Periodoncia (AAP) ha realizado diversas clasificaciones de las enfermedades periodontales, que han ido cambiando en función de nuevos conceptos, siendo aceptada actualmente la clasificación del año 1999, donde se acordó incluir una categoría que hiciera alusión a los problemas localizados a nivel gingival.^{52,53} Así esta última clasificación divide las enfermedades periodontales en dos grandes grupos:

Gingivitis. Incluye los procesos que afectan la encía, es una inflamación de los tejidos blandos que rodean al diente sin extenderse al cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. Es la forma más leve de la enfermedad periodontal y presenta alta prevalencia en la población a nivel mundial.⁵³ La gingivitis tiene una etiología multifactorial donde se encuentran factores como la placa bacteriana, virus, hongos, factores sistémicos, consumo de algunos medicamentos, mal nutrición, la pubertad y factores genéticos entre otros.⁵³

Periodontitis. Es el proceso que compromete todas las estructuras del periodonto; es un proceso destructivo con pérdida de hueso y ligamento periodontal. La periodontitis se puede desarrollar a partir de una gingivitis pre-existente en pacientes inmunosuprimidos, en presencia de factores de riesgo y mediadores pro-inflamatorios, así como también ante la presencia de flora microbiana periodontopatogénica. Las velocidades de destrucción se pueden clasificar en dos fases: la primera es la periodontitis crónica que es la más común y se caracteriza por ser de evolución lenta, la segunda fase es la periodontitis agresiva que se caracteriza por ser de muy rápida evolución en la destrucción de los tejidos y en el

tiempo que transcurre desde su inicio hasta la pérdida del diente. De las dos fases de la periodontitis se hará énfasis en la forma crónica.⁵⁴

3.2.2.2 Periodontitis Crónica

Es la forma más común de periodontitis, esta enfermedad se caracteriza por presentar diversos grados de progresión inflamatoria, que va acompañada de formación de sacos y pérdida de hueso alveolar. La periodontitis crónica se inicia por la acumulación local de microorganismos (biofilm sobre el diente-encía) y sus productos metabólicos que estimulan al epitelio de unión a proliferar y formar proteinasas destructoras de tejido que degradan la membrana basal y da paso a la migración apical del epitelio de unión a lo largo de la superficie radicular del diente, profundizando así el surco gingival formando bolsas periodontales asociado con pérdida de inserción ósea. Esta patología puede demorar años en relación al tiempo que transcurre el inicio de la enfermedad hasta que se llegue a perder los dientes, la periodontitis crónica también puede pasar por periodos de mayor actividad y rapidez en la destrucción.^{54, 55}

La Periodontitis crónica se presenta en personas por encima de 40 años, pero puede ocurrir a cualquier edad. Se inicia como gingivitis durante la pubertad o poco después de ella, pero los síntomas como pérdida ósea y de inserción no se observan hasta más tarde.⁵⁴

3.2.2.2.1 Epidemiología

En España, la última encuesta de Salud Bucal realizada (2005) muestra que sólo el 14,8 % de los adultos tendría las encías sanas. El 59,8 % tendría gingivitis, y el

25,4 % periodontitis. En personas de 65-74 años, sólo el 10,3 % tendría las encías sanas, el resto tendría algún tipo de enfermedad periodontal.⁵⁶

En Chile, la primera encuesta de examinación dental nacional (2007) mostro una alta prevalencia de enfermedad periodontal en su población. El 38.65 % de adultos jóvenes (35-44 años) y 69.35 % de adultos mayores (65-74 años) presenta periodontitis crónica con profundidad de sondaje > 6mm.⁵⁷

En Argentina, se realizó un estudio para evaluar la necesidad de tratamiento periodontal de pacientes adultos, se determinó que 14.3 % presentaban bolsas mayores a 5mm, 26.4 % profundidad de sondaje de 3.5-5 mm.⁵⁸

En Perú, se realizó un estudio para determinar la prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y su consecuente necesidad de tratamiento en 263 varones entre 17 y 21 años. Se determinó que la profundidad al sondaje entre 4-5 mm fue de 22.4 %, pérdida de fijación entre 4-5 mm fue de 21.5 % y entre 6-8 mm fue 1.1 %⁵⁹

3.2.2.2.2 Clasificación

La clasificación de la periodontitis crónica se establece en función de los criterios de extensión y severidad.^{54, 55, 60}

- Según su extensión: puede ocurrir en una forma localizada < 30 % de los sitios están comprometidos o una forma más generalizada en que > 30 % de los sitios muestran profundidad de bolsa aumentada y pérdida ósea.
- Según su severidad: basado en el nivel de destrucción y pérdida de inserción, puede ser leve (1-2 mm), moderada (3-4 mm) o severa (≥5 mm).

3.2.2.2.3 Factores de riesgo

Existe una serie de condiciones o factores de riesgo que pueden predisponer a los individuos a desarrollar esta enfermedad, entre ellos tenemos verdaderos factores de riesgo (tabaco, diabetes y algunas enfermedades sistémicas), indicadores de riesgo (estrés, osteoporosis, obesidad, higiene oral, apiñamiento dental, embarazo, uso de anticonceptivos), determinantes de riesgo (edad, género, estatus socioeconómico). Determinar los factores de riesgo permite establecer recomendaciones en la prevención y estrategias en el manejo general de la enfermedad periodontal.⁵⁴

3.2.2.2.4 Diagnóstico

El examen del estado periodontal de un paciente incluye la valoración de una serie de pruebas diagnósticas basadas en parámetros clínicos como el nivel de inserción, profundidad de sondaje, sangrado al sondaje, recesiones, furcaciones y movilidad, que deben ser registrados en la ficha clínica periodontal o periodontograma como parte de la historia clínica.⁵⁵

La historia clínica, médica y odontológica, y el examen radiográfico así como la evaluación de los factores de riesgo son importantes para realizar un diagnóstico seguro, pronóstico y tratamiento óptimo.

3.2.2.2.5 Agente etiológico

El concepto acerca de la etiología multifactorial de las enfermedades periodontales establece que éstas se producen por la interacción del agente

microbiano, factor etiológico primario necesario pero no suficiente, huésped susceptible y factores de riesgo que influye sobre ambos.⁶¹

Según la literatura se indica que más de 300 especies diferentes de bacterias son aisladas de bolsas periodontales, solo un pequeño porcentaje de ellas se consideran como potenciales patógenos.^{5, 61} Por esta razón se dice que las especies bacterianas proteolíticas, asacarolíticas y de débil fermentación son las que se encuentran en mayor presencia en el biofilm dental subgingival, y por ello se constituyen como los principales agentes etiológicos de las patologías periodontales.^{61, 62}

Diferentes investigaciones periodontales han encontrado reportes similares en los periodontopatógenos hallados en los pacientes con periodontitis crónica, presentándose *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. nigrescens* y *P. intermedia* entre otras.^{63,64,65} De todos estos microorganismos aislados en periodontitis crónica los más prevalentes según la literatura y estudios realizados anteriormente se encuentran *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* que forman parte del grupo de Bacilos negro pigmentantes.⁶⁶

3.2.2.2.6. Principales Periodontopatógenos

La enfermedad periodontal está asociada a la presencia de microorganismos patógenos en la placa subgingival, principalmente por especies anaerobias Gram negativas, que colonizan y proliferan en el tejido periodontal y a la susceptibilidad del hospedero.⁶¹

3.2.2.2.6.1. Bacilos Negro Pigmentantes

Los Bacilos Negro Pigmentantes son un grupo de bacterias bacilares, anaerobias estrictas, Gram negativas. Comprende principalmente algunas especies del género *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides* y *Fusobacterium*, los cuales están clasificados dentro de la familia Bacteroidaceae.⁶¹ Se ha comprobado que existe mayor prevalencia de BNP a mayor profundidad de la bolsa periodontal.

3.2.2.2.6.2. Género *Porphyromonas*

La especie del género *Porphyromonas*, se caracteriza por presentar bacilos cortos o cocobacilos, no móviles, no esporulados, son anaerobios estrictos y Gram negativos. Carecen de metabolismo fermentativo, por lo que son llamados asacarolíticas, utilizan sustratos nitrogenados como fuente de energía. Se caracterizan, además, por producir un pigmento negro en sus colonias, característica que se observa en medios de cultivo que contienen sangre lisada, hemina y vitamina K. Dicha pigmentación se debe a la presencia de hemina y protoporfirina. La hemina, producto de la descomposición de la hemoglobina es un factor relevante para el crecimiento de estas bacterias tanto *in vivo* como *in vitro*.

61

Porphyromonas gingivalis, es un cocobacilo o bacilo corto con un diámetro aproximado de 0.5 a 0.8 µm x 1.0 a 3.5 µm de largo, anaerobio estricto, Gram negativo, no móvil, asacarolítico, son capsulados, no esporulados, con numerosas fimbrias de diferentes tipos, que forma colonias uniformes de coloración pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular.

Asociada a la etiología de la enfermedad periodontal, como la periodontitis crónica, se aísla del surco gingival especialmente cuando no existe una buena salud periodontal. El poder patógeno de esta bacteria en la colonización, destrucción del tejido periodontal y evasión de las defensas del hospedero, tiene relación con un gran número de factores de virulencia, tales como: Cápsula, constituida por polisacáridos, juega un rol importante en la evasión del sistema inmunológico, eludiendo la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento; Fimbrias, que se comportan como adhesinas, intervienen en el proceso de adhesión a tejidos del hospedero y en la coagregación bacteriana; Hemaglutininas, participan en la aglutinación de hematíes en los inicios de la colonización tisular; Lipopolisacáridos, asociado con la inflamación gingival, destrucción de tejido conectivo y reabsorción de hueso alveolar por activación de osteoclastos, liberación de prostaglandinas E_2 y producción de IL-6 e IL-8 ; Vesículas superficiales, que participan en la captación de nutrientes; Proteinasa, compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano y degradan diferentes tipos de colágeno. Las proteinasas de tipo cisteinproteasas son llamadas gingipainas y producen el 85% de la actividad proteolítica generada por *P. gingivalis* y el 100% de la actividad tipo tripsina. Entre las acciones que producen esta la degradación de fibronectina, fibrinógeno y de las uniones de las células epiteliales e interrumpen la defensa del huésped al degradar IL8 un importante quimiotáctico; Inductor de metaloproteinasas de la matriz, estas metaloproteinasas degradan la mayoría de moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, fibronectina y la lámina. *P. gingivalis* inactiva los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, específicamente el tipo 1, que tiene mucha relación con la destrucción del colágeno tipo I y fibronectina.^{66,67}

3.2.2.2.6.3. Género *Prevotella*

Las especies que conforman el Género *Prevotella* son bacilos cortos, pleomórficos, no móviles, no esporulados. Capaces de producir pigmentos, moderadamente fermentativos. Al igual que *Porphyromonas*, son exigentes en cuanto a vitamina K, hemina y sangre para su crecimiento.⁶¹ *Prevotella* incorpora varias especies pigmentadas de negro y no pigmentadas. Las especies pigmentadas corresponden al grupo de bacilos anaeróbicos Gram negativos, pertenecen a este grupo: *P. intermedia*, *P. negriscens*, *P.corporis*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. denticola*.

Prevotella intermedia son bacterias anaerobias, Gram negativas, sus colonias fluorescen bajo luz ultravioleta de onda larga y al microscopio se observan como cocobacilos o bastones alargados. *P. intermedia* tiene enzimas protectoras contra el oxígeno como la superóxido dismutasa, la peroxidasa, además, tiene factores de virulencia como la cápsula que la protege contra la fagocitosis y de la destrucción de los leucocitos y la enzima proteasa que es uno de los principales factores responsables para el progreso de la enfermedad periodontal.⁶⁸

3.2.2.2.7. Tratamiento

El tratamiento periodontal convencional implica el desbridamiento mecánico de la placa supragingival y subgingival, lo que se traduce en una reducción total de la microbiota. Sin embargo, la recolonización hacia los niveles de pretratamiento se produce en cuestión de semanas y el restablecimiento de una microbiota patógena se produce dentro de meses. La dinámica de esta recolonización depende del nivel de higiene oral, de la eficacia del desbridamiento subgingival y de la existencia de bolsas residuales, incluso el uso de antibióticos o antisépticos

orales o sistémicos no mejora el efecto de la terapia periodontal a largo plazo. Además, el crecimiento exponencial de las resistencias bacterianas a los antibióticos lleva a los científicos a desarrollar nuevas alternativas contra las enfermedades infecciosas, considerándose el uso de probióticos como una opción seria para el tratamiento de estas enfermedades.

Las periodontitis crónicas son iniciadas por los biofilms de la placa bacteriana pero la severidad y la progresión de la enfermedad están determinadas por la respuesta del huésped; en base a estos factores se planteó dos grandes estrategias contra las enfermedades periodontales: la eliminación de patógenos específicos y la supresión de la respuesta destructiva del huésped.⁶⁹ Se cree que la terapia probiótica puede ser de utilidad para lograr el objetivo de estos tratamientos.²

3.2.3 Probióticos y Enfermedad Periodontal

La salud oral es una parte integral de la salud general y ésta puede ser lograda con una buena higiene oral. El mantenimiento de la higiene oral está directamente relacionada con el control de la placa, existen diferentes métodos para el control de la placa, el control mecánico y el uso de agentes químicos como antibióticos y antisépticos. Aunque estos métodos han demostrado su eficacia solo mejoran el resultado del tratamiento temporalmente y su continuo y prolongado uso puede causar más daño que bien.

Debido a la aparición de resistencia a los antibióticos y la recolonización frecuente de bacterias patógenas en los sitios tratados, existe la necesidad de un nuevo enfoque de tratamiento para la enfermedad periodontal; por ello, la introducción

de probióticos y la terapia de reemplazo bacteriano en el campo de la periodoncia.^{70,71,72}

3.2.3.1 Mecanismos de acción en la cavidad oral

Los mecanismos de acción de los probióticos sobre la boca se espera que sean similares a lo observado en otras partes del cuerpo. Por ejemplo las bacterias orales probióticas deben adherirse y colonizar los tejidos periodontales incluyendo las superficies duras y debe convertirse en parte del biofilm. Los posibles mecanismos de acción de los probióticos que se considera que pueden influir en la cavidad oral son tres: (1) La modulación de las defensas del huésped, tanto de la inmunidad innata como la adquirida, (2) La producción de sustancias antimicrobianas contra patógenos periodontales y (3) Los mecanismos de exclusión competitiva.^{73, 74, 75}

3.2.3.1.1 Regulación inmune

Los probióticos pueden actuar sobre una amplia variedad de células para modular el sistema inmune y ejercer una acción antiinflamatoria. Las bacterias probióticas o sus productos (por ejemplo, metabolitos, los componentes de la pared celular y el ADN) pueden ser reconocidos por las células del huésped, como las células epiteliales y las células inmunes. Se ha observado que las bacterias probióticas (*L. acidophilus* CRL 730 y *L. casei* CRL 431) son capaces de aumentar la capacidad fagocítica de los macrófagos.⁷³

Ince Gize observaron reducciones estadísticamente significativas de MMP-8 y altos niveles de TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas) después de la administración oral de *L. reuteri* en pacientes con periodontitis crónica.⁷⁶

Szkaradkiewicz A. observó que la administración oral de *L. reuteri* podría inducir una reducción significativa de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-17) en pacientes con periodontitis crónica.¹²

Staab observó que una leche probiótica, que contenía *L. casei* cepa Shirota, era capaz de disminuir significativamente la elastasa y la MMP-3 en fluido crevicular.⁷³

Twetman observó reducciones estadísticamente significativas de TNF- α e IL-8 en el fluido crevicular, después del uso de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y ATCC PTA 5289.¹⁹

Della Riccia puso a prueba *in vivo* los efectos inmunomoduladores de *Lactobacillus brevis* CD2 en la enfermedad periodontal. El uso *in vivo* de este probiótico dio lugar a una significativa disminución de los marcadores inflamatorios en la saliva, como las metaloproteinasas y los niveles de óxido nítrico, actividad sintetasa, prostaglandina E₂ e IFN-gamma. No se observó ningún efecto sobre los niveles de IgA.⁷⁷

3.2.3.1.2 Sustancias antimicrobianas producidas por los probióticos

Las bacterias probióticas pueden producir una amplia gamma de compuestos que actúan como agentes antimicrobianos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

Los ácidos grasos de cadena corta, como los ácidos lácticos, pueden pasar a través de la membrana de la célula bacteriana y acidificar el citoplasma, que a su vez puede inhibir la proliferación bacteriana. En este sentido, Sookkhee fue capaz de aislar bacterias de ácido láctico de la cavidad oral de personas sanas y demostraron que había una actividad antimicrobiana frente *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.⁷³ Kawai observó que dos cepas de *L. plantarum* (derivadas de la cavidad oral) y *L. fermentum* (derivado de un producto lácteo) ejercieron efecto inhibitorio frente a *P.gingivalis*. La sustancia antibacteriana de *L. plantarum* contra *P. gingivalis* era lactato de sodio, y la de *L. fermentum* era una novedosa sustancia de bajo peso molecular. Esta sustancia antibacteriana podría ser de uso para la prevención de la enfermedad periodontal.⁷⁸ Koll-Klais observó una mayor prevalencia de lactobacilos homofermentativos obligatorios, especialmente *L. gasseri*, entre personas sanas en comparación con personas con periodontitis. Además, observaron que las cepas de *L. gasseri* de las personas sanas tenían una mayor actividad antimicrobiana contra *A. actinomycetemcomitans* que las cepas de los pacientes con periodontitis crónica. Los lactobacilos homofermentativos producen mayores concentraciones de ácido láctico en comparación con lactobacilos heterofermentativos e inducen, por tanto, una inhibición más pronunciada de determinados patógenos periodontales.⁷⁹

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la producción de peróxido de hidrógeno por las células probióticas puede inhibir de las especies patógenas. En ese sentido Hillman y Shivers demostraron, en un modelo de rata gnotobiótica, que el nivel de colonización de *A. actinomycetemcomitans* en las ratas previamente infectadas con una cepa de *S. sanguinis*, productora de peróxido de hidrógeno, fue 45 veces menor que en los animales no infectados con esta cepa.⁷³

Las bacteriocinas son péptidos catiónicos sintetizados por los ribosomas, las cuales se han visto que son capaces de destruir bacterias. Se han descrito varias bacteriocinas derivadas de bacterias orales endógenas. *S. salivarius* produce incluso dos potentes bacteriocinas, salivaricina tipos A y B. La salivaricina B fue utilizada con eficacia para el tratamiento de la halitosis causada por especies de *Prevotella* y *Parvimonas micra*.⁷³ La bacteriocina de *Lactobacillus paracasei* HL32 demostró ser capaz de destruir *P. gingivalis*, causando la formación de poros sobre su cápsula celular.⁸⁰ En un reciente estudio dos cepas de *Lactobacillus plantarum* NC8 y 44048 fueron capaces de inhibir *P. gingivalis*. Las bacteriocinas de *L. plantarum* fueron capaces de unirse y causar distorsión celular a través de la separación de la membrana externa y la lisis bacteriana.⁸¹ Ishikawa evaluó la inhibición de BNP *in vitro* de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. nigrescens* por *L. salivarius*.⁸²

3.2.3.1.3 Exclusión competitiva

El principio de la exclusión competitiva afirma que dos especies que compiten por los mismos recursos no pueden coexistir de manera estable. Uno de los dos competidores siempre tiene una ligera ventaja sobre el otro, lo que va a conducir a la extinción del segundo competidor o a un cambio de esta especie a otro lugar. El mecanismo de exclusión competitiva utilizada por las bacterias beneficiosas puede ocurrir a dos niveles: a) impidiendo la adhesión de bacterias patógenas o b) compitiendo por los mismos nutrientes.

a) Impidiendo la adhesión de bacterias patógenas

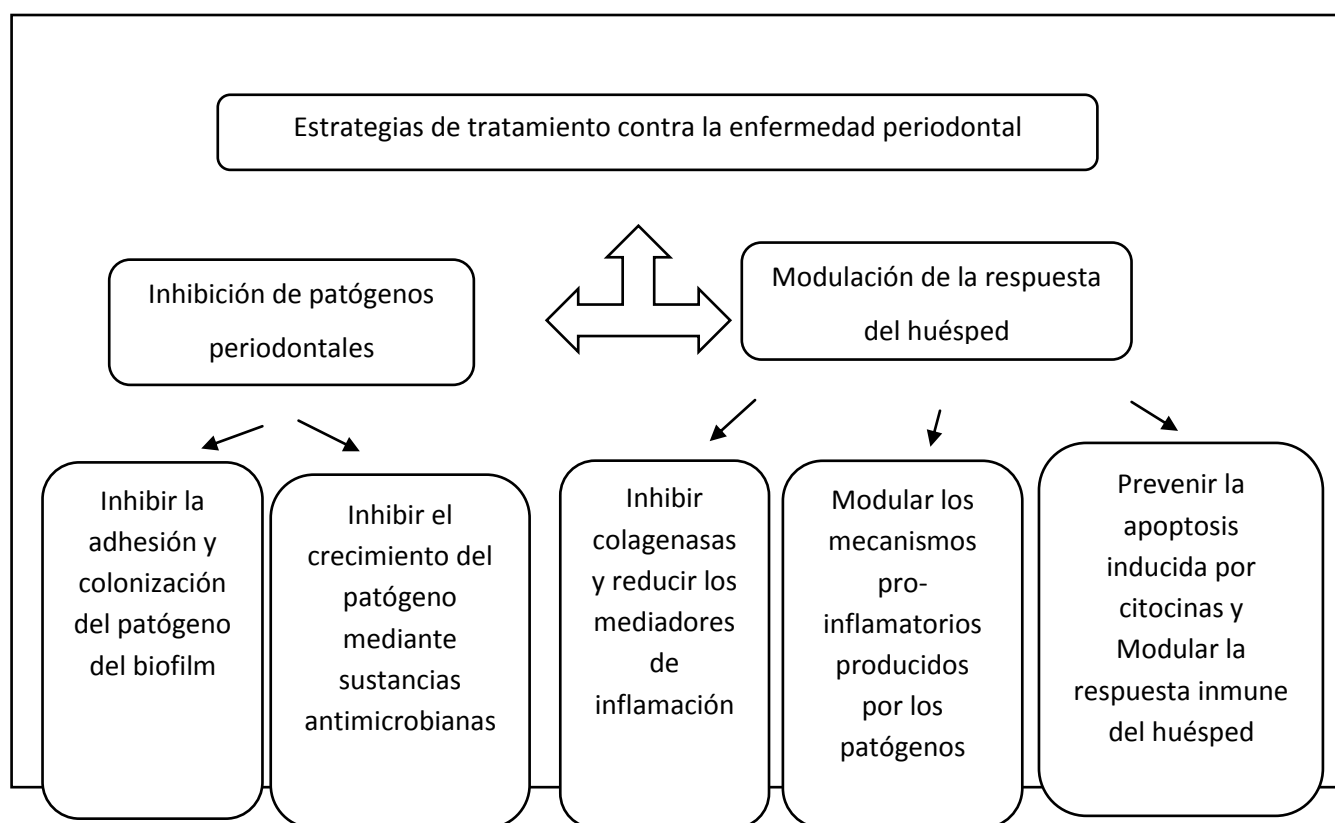
Se ha demostrado que varias cepas bacterianas, principalmente estreptococos, pueden impedir la colonización de patógenos periodontales a superficies de

tejidos duros y blandos *in vitro*. Una forma alternativa que tienen las cepas probióticas para impedir la adhesión de bacterias patógenas es la producción de biosurfactantes y modificación de la composición de la proteína del .⁷³

b) Competencia por los nutrientes esenciales

Las bacterias pueden competir por ciertos nutrientes esenciales o productos químicos necesarios para el crecimiento, y al hacerlo pueden inhibir el crecimiento de un patógeno. Por ejemplo *Prevotella intermedia* utiliza la vitamina K para crecer.⁷³

Figura 1. Estrategias de tratamiento contra la enfermedad periodontal.



Fuente. Iniesta M. El control del biofilm y los probióticos. Rev Soc Esp Periodn Osteoint

2012, 22 (4) pag 275

3.3. Definición de Términos Básicos

Probiótico: microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en la salud del huésped.⁷¹

Actividad antibacteriana: se define como la capacidad de matar, inhibir y/o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.⁸³

Sustancias producidas por *Lactobacillus*: los probióticos liberan componentes antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.²⁵

3.4. Hipótesis

Existe susceptibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes aislados de bolsas periodontales frente a sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri*.

3.5. Operacionalización de variables

-Variable Independiente

Sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus*.

-Variable Dependiente

Sensibilidad de Bacilos Negro Pigmentantes (BNP)

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Valor
Sustancias antibacterianas producidas por <i>Lactobacillus</i>	Mezcla de sustancias químicas producidas por un ser vivo que matan o impiden el crecimiento de bacterias sensibles a ellas.	Antibacteriano	Tipo de lactobacilo	Nominal	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
Sensibilidad de BNP	Efecto de destruir o inhibir el crecimiento bacteriano de BNP	Grado de sensibilidad de BNP frente a sustancias producidas por <i>L. reuteri</i>	Clasificación de los diámetros de los halos de inhibición en los grados de sensibilidad	Ordinal	0-8 mm (sensibilidad nula) 9-14 mm (sensibilidad baja) 15-19 mm (sensibilidad media) 20 a más (Sumamente sensible)
		Tamaño de halo de inhibición	Tamaño del diámetro del halo de inhibición	Razón	mm

IV. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de investigación

El presente estudio corresponde a una investigación tipo experimental, prospectivo e *in vitro*.

- Experimental porque se valoró el efecto de una o más variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.
- Prospectivo porque los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo en el futuro.
- *In vitro* porque la técnica para realizar el experimento se realizó en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

4.2. Población y muestra

4.2.1. Población

El universo fueron las bacterias periodontopatógenas Gram negativas presentes en las bolsas periodontales de pacientes con Periodontitis Crónica que acudieron a la Clínica de Periodoncia de Pregrado y Postgrado de la Facultad de Odontología de la UNMSM.

4.2.2. Muestra

4.2.2.1. Tipo de Muestreo

No probabilístico intencional, pues antes de incluir a las cepas en el estudio se determinó si cumplían con los criterios de inclusión.

4.2.2.2. Unidad de muestra

Biofilm dental subgingival

4.2.2.3. Unidad de análisis

Conformada por los Bacilos Negro Pigmentantes sometidos a la prueba de sensibilidad.

4.2.2.4. Criterios de inclusión y exclusión de la muestra

Presentaron los siguientes criterios de inclusión

- Bacterias periodontopatógenas Gram negativos
- Bacterias bacilares anaerobias estrictas
- Bacterias Negro Pigmentantes

Presentaron los siguientes criterios de exclusión

- Bacterias que no muestren potencial de crecimiento positivo luego del cultivo en el medio anaerobio.
- Bacterias que no muestren pigmentos de color negro luego del cultivo

4.3. Procedimientos y Técnicas

➤ Microorganismos patógenos

Bacilos Negro Pigmentantes

➤ Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

BAL en estudio: *Lactobacillus reuteri*

BAL referencial (control positivo): *Lactobacillus plantarum* E2 productora de sustancias antimicrobianas.

BAL sensible o indicadora a sustancias antimicrobianas: *Lactobacillus fermentum* ChJ4C

✓ La susceptibilidad de *Lactobacillus fermentum* ChJ4C frente a las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus plantarum* E2 ha sido estudiada en varias pruebas *in vitro* por la Blga. Elena Quillama Polo.^{84,85}

4.3.1. Obtención de Bacilos Negro Pigmentantes

Se trabajó con cultivos puros de Bacilos Negro Pigmentantes obtenidos de muestras de bolsas periodontales de pacientes con Periodontitis crónica atendidos en la Facultad de Odontología de la UNMSM.

Se seleccionó los dientes con mayor profundidad de bolsa periodontal, previo sondaje, se aisló con torundas de algodón o gasa estéril alrededor del mismo y se eliminó cuidadosamente la placa supragingival de la zona. Luego se procedió a tomar la muestra con conos de papel estériles número 30 o 40, los cuales se introdujeron en el espacio subgingival por un tiempo aproximado de 60 segundos para después colocarlos inmediatamente en tubos que contenían 2 ml de medio de transporte estéril BHI (Brain Heart Infussion). Una vez obtenida la muestra será transportada al laboratorio para su procesamiento.

En el laboratorio se prepararon diluciones seriadas de la muestra en criotubos en suspensiones 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} de BHI. Para la siembra de muestras se tomaron 100 μ l de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se depositó la última dilución en una placa de

Agar Sangre suplementado con Hemina-Menadiona (Agar Schaedler). La muestra se esparció uniformemente en la superficie del agar con un asa de Digrafsky. Las placas sembradas se incubaron en una jarra hermética conteniendo un generador de anaerobiosis (Anaerocult, Merck) por 7-14 días a 37°C, hasta observar el crecimiento de las colonias, de éstas se eligieron las colonias circulares, convexas, de tamaño aproximado de 0.5-2 mm, lisas y pigmentadas de color oscuro, Gram (-) para su posterior resiembra con un asa en la superficie de las nuevas placas de agar Schaedler. De igual manera, las placas sembradas se incubaron en un Sistema Generador de Anaerobiosis por 7-14 días a 37°C. Finalmente, a los 7-14 días se tomó 6 colonias de BNP y se inocularon en 6 tubos que contenían caldo Tioglicolato con Hemina-Menadiona, se incubaron a 37°C por 4 días en condiciones anaeróbicas.

4.3.2. Obtención de las Bacterias Acido Lácticas

4.3.2.1. Obtención de *Lactobacillus reuteri*

La cepa *Lactobacillus reuteri* se obtuvo del producto probiótico BioGaia Protectis (*Lactobacillus reuteri* DSM17938)

Primero, se tomó una muestra del producto probiótico (100 µl) y se inoculó en tubos de ensayo que contenía 2ml de Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) y se incubó a 30°C por 16-24 horas en condiciones de microaerofilia. Luego se tomó una muestra de 100 µl a un tubo de ensayo que contenía 2ml de Caldo MRS y se incubó por 48 horas, se realizó el mismo procedimiento un par de veces más con la finalidad de obtener un cultivo puro y activo a las 24 horas. Posteriormente se tomó una asada del cultivo para sembrar por estría en agar MRS. Las placas se incubaron a 30°C por 24 horas. Después del crecimiento de las colonias se realizó

tinción Gram, además de considerar las características morfológicas típicas de las BAL, como la formación de colonias blancas puntiformes. También se consideró que las colonias estén lo suficientemente aisladas para permitir la selección de la colonia que se utilizó para realizar la prueba de inhibición.

4.3.2.2. *Lactobacillus plantarum* (Control positivo)

Lactobacillus plantarum E2 (cepa referencial), fue proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Se tomó una muestra del cultivo puro (100µl) y se inoculó en un tubo de ensayo que contenía 2 ml de Caldo MRS por 24 horas a 30°C en condiciones de microaerofilia. Para su posterior enfrentamiento con BNP y *L. fermentum*.

4.3.2.3. *Lactobacillus fermentum*

Lactobacillus fermentum ChJ4C (cepa indicadora), fue proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Se tomó una muestra del cultivo puro (100µl) y se inoculó en un tubo de ensayo que contenía 2 ml de Caldo MRS por 16-18 horas a 30°C en condiciones de microaerofilia.

4.3.3. Prueba de actividad inhibitoria

Se llevó a cabo mediante el Test de doble capa de agar o de revestimiento de agar. De las colonias aisladas de *Lactobacillus*, se seleccionó una, se sembró en un tubo conteniendo 2 ml de caldo MRS y se incubó por 24 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, se vaciaron 10 ml de agar MRS en placas Petri, una vez solidificado, se dividió el fondo de la placa en cuatro segmentos iguales (3/1 y 2/2)) y se depositó cuidadosamente una gota de 1.5 µl de cada tubo conteniendo la bacteria *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum* respectivamente, y se incubaron a 30°C por 24 horas. Luego, las capas se cubren con una sobre capa de 10ml de agar Tioglicolato + Hemina + Menadiona (agar 1 %, semisólido) el cual fue previamente inoculado con 100 µl de cada cultivo de BNP y se dejó solidificar durante 10 minutos. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 5 días.

La prueba de susceptibilidad de *L. fermentum* frente a *L. reuteri* y *L. plantarum* siguió el mismo procedimiento. Las capas de agar MRS con *L. reuteri* y *L. plantarum* se cubrieron con una sobre capa de 10 ml de agar MRS semisólido el cual fue previamente inoculado con 100 µl de *L. fermentum* y se dejó solidificar durante 10 minutos. Las placas se incubaron a 30°C en condiciones de microaerofilia.

4.4. Procesamiento de Datos

Se utilizó una ficha de recolección de datos que fue llenada por el investigador. La interpretación de los resultados se realizó de la siguiente manera:

- La falta de crecimiento alrededor de las colonias de *L. reuteri* y *L. plantarum* indica que son “S, sensibles” a las sustancias antimicrobianas secretadas por las bacterias lácticas.

- El crecimiento del microorganismo sobre las colonias de *L. reuteri* y *L. plantarum* indica que es “R, resistente” a las sustancias antimicrobianas.

4.5. Análisis de resultados

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software STATA Versión 12.

V. RESULTADOS

Se realizaron 10 ensayos válidos para cada cepa de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum*, donde se obtuvieron los resultados observados en la Figura 2. Las mediciones de los halos de inhibición fueron registradas en la ficha de recolección de datos, que se observa en la Tabla 1.

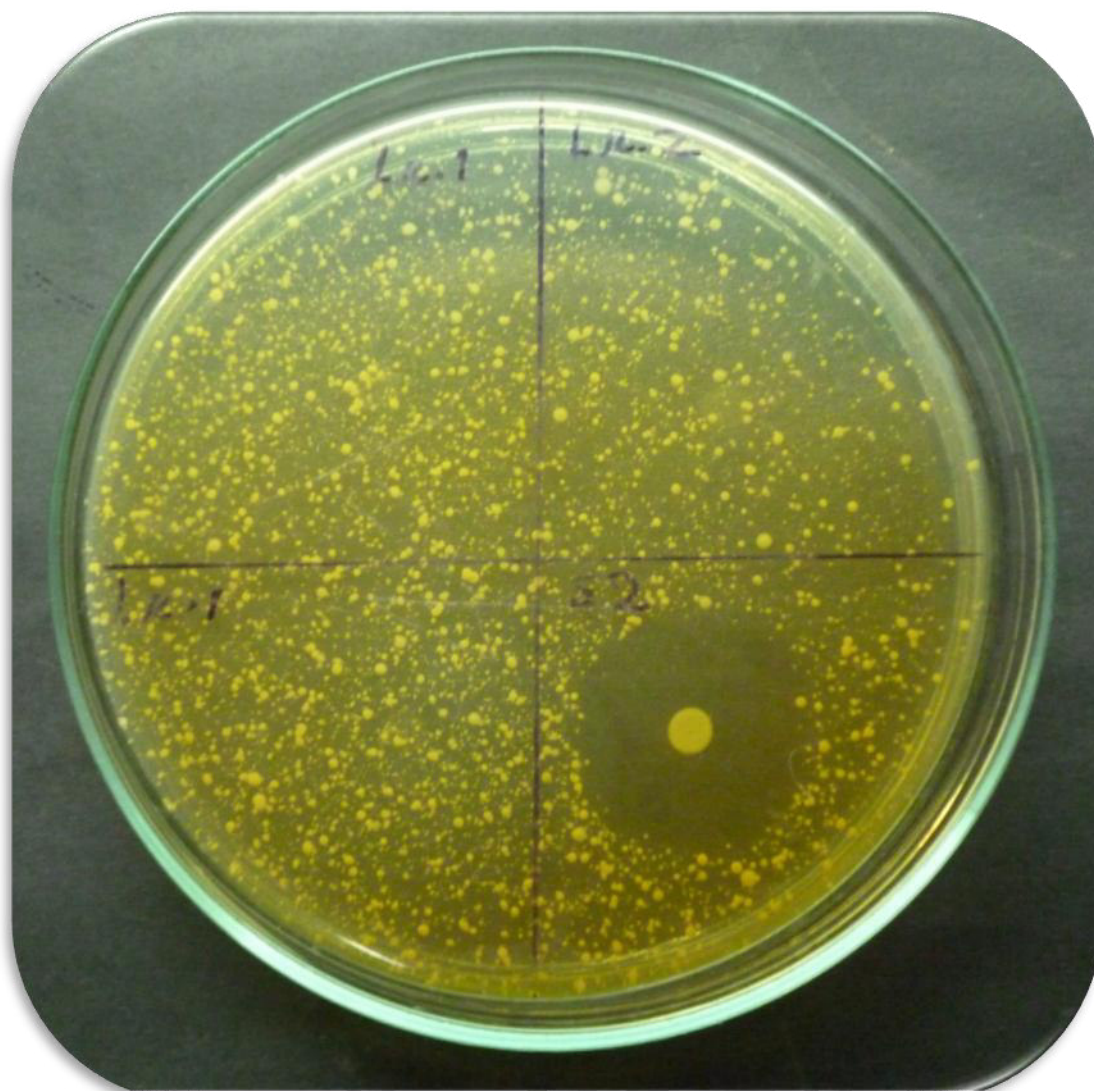


Figura 2. Halos de inhibición en BNP frente a *L. reuteri* y *L. plantarum*

Se realizaron 4 ensayos válidos para cada cepa de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum*, donde se obtuvieron los resultados observados en la Figura 3. Las mediciones de los halos de inhibición fueron registradas en la ficha de recolección de datos, que se observa en la Tabla 1.

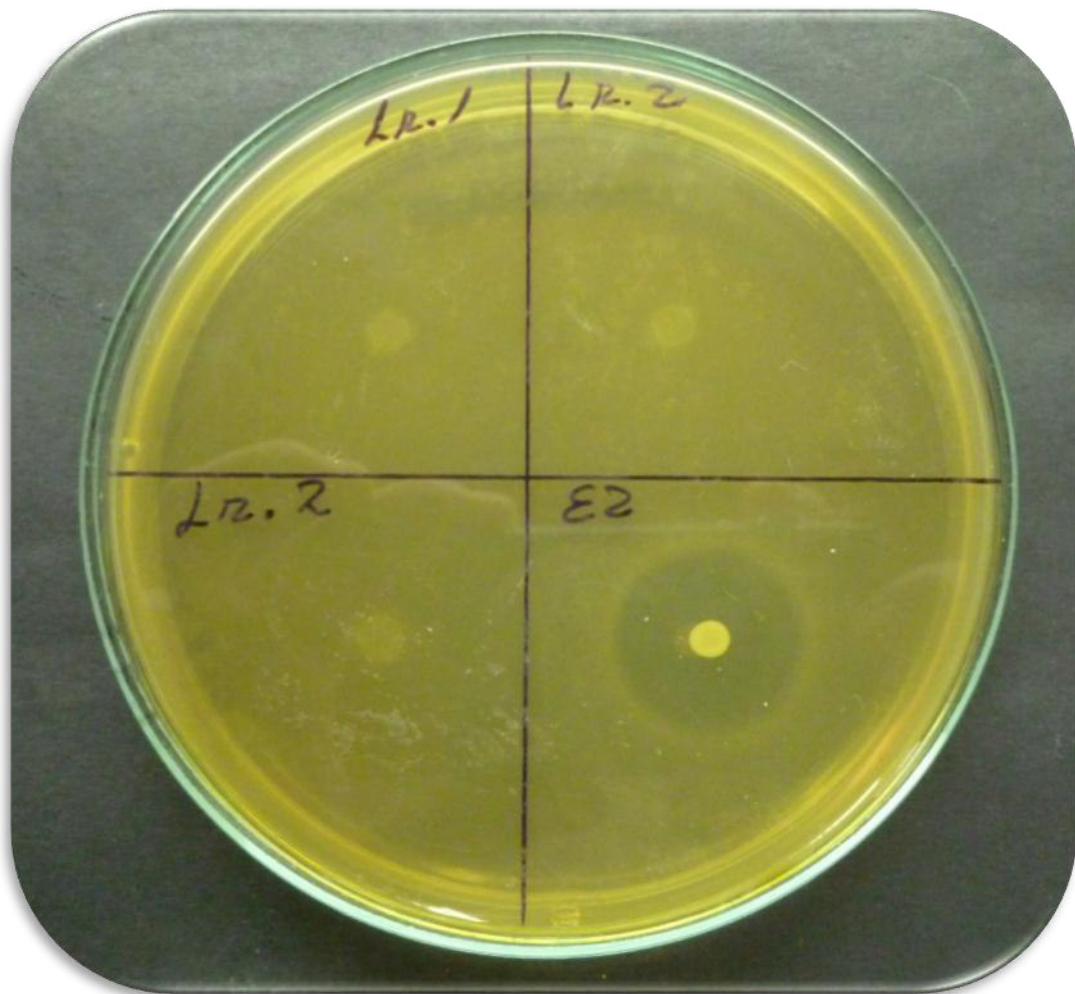


Figura 3. Halos de inhibición en *L. fermentum* frente a *L. reuteri* y *L. plantarum*

Tabla 1. Mediciones de los halos de inhibición de *L. reuteri* y *L. plantarum* sobre BNP y *L. fermentum*

Prueba de Sensibilidad														
	BNP (Halos de Inhibición en mm)										<i>L. fermentum</i> (Halos de inhibición en mm)			
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P1	P2	P3	P4
<i>L. reuteri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	6	6
<i>L. plantarum</i>	24	18	10	12	12	14	12	20	14	16	24	23	23	22

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño del crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* (Lr y Lp) de 5 mm.

Con los datos obtenidos, observamos que:

- Las sustancias producidas por *L. reuteri* no ejercen sensibilidad en el crecimiento los BNP.
- *Lactobacillus plantarum* libera sustancias antibacterianas capaces de inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- En nuestros resultados observamos también que *L. fermentum* es sensible a las sustancias secretadas por *L. reuteri*, por lo que determinamos que *L. reuteri* sí libera sustancias antimicrobianas capaces de inhibir bacterias Gram positivas mas no Gram negativas

5.1. Grado de sensibilidad de BNP a través de la clasificación de los halos de inhibición frente a sustancias antimicrobianas producidas por *L. plantarum* y *L. reuteri*.

Tabla 2. Grado de sensibilidad de BNP frente a *L. plantarum*

	Nº	%
Sensibilidad nula	0	0
Sensibilidad baja	6	60
Sensibilidad media	2	20
Sumamente sensible	2	20
Total	10	100

L. reuteri no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de BNP.

Se observa que el grado de sensibilidad de BNP frente a *L. plantarum* en su mayoría 60% presenta sensibilidad baja.

5.2. Sensibilidad de BNP a través de los halos de medición frente a sustancias antimicrobianas producidas por *L. plantarum* y *L. reuteri*

Tabla 3. Halos de inhibición de BNP frente a *L. plantarum*

	BNP					
	Nº	Media (mm)	Mediana (mm)	D.S	Valor max.	Valor min.
<i>L. plantarum</i>	10	15.2	14	4.34	24	10

L. reuteri no ejerce ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de BNP.

Los resultados indican que la mediana de los halos de inhibición de *L. plantarum* fue de 14 mm el cual nos da una sensibilidad baja, con un diámetro mayor de 24 mm sobre el crecimiento de BNP.

5.3. Sensibilidad de *L. fermentum* frente a sustancias antimicrobianas producidas por *L. reuteri* y *L. plantarum*

Tabla 4. Halos de inhibición promedio de *L. reuteri* y *L. plantarum*

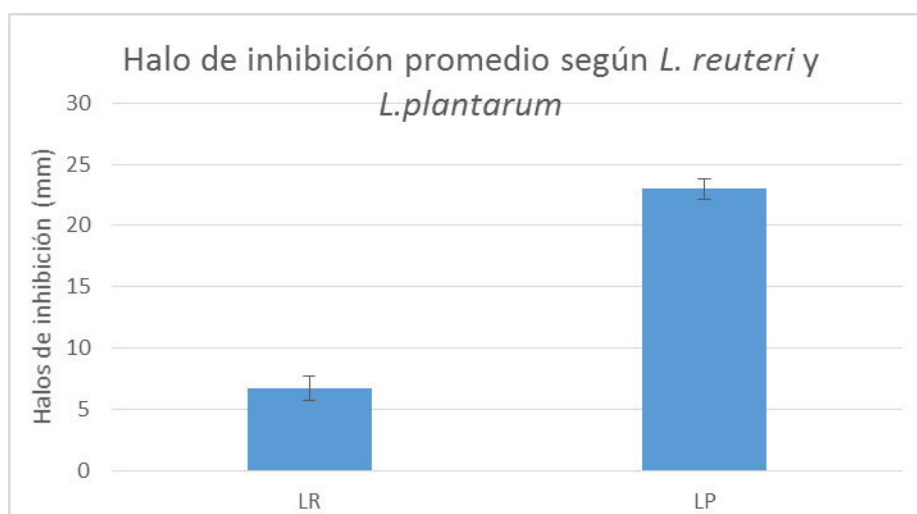
	<i>L. fermentum</i>					
	N°	Media (mm)	D.S	Valor max.	Valor Min.	P
<i>L. reuteri</i>	4	6.75	0.96	8	6	0.00<0.005
<i>L. plantarum</i>	4	23	0.82	24	22	

La media de los halos de inhibición que ejercen las sustancias producidas por *L. reuteri* frente a *L. fermentum* es de 6.75 mm, con un valor máximo de 8 mm.

La media de los halos de inhibición que ejercen las sustancias producidas por *L. plantarum* frente a *L. fermentum* es de 23 mm, con un valor máximo de 24 mm.

El resultado de la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney estandarizó un valor de Z de -2.34, el cual nos muestra que existe diferencia significativa entre los valores de *L. reuteri* y *L. plantarum* ($p<0.05$).

Figura 4. Halo de inhibición promedio según *L. reuteri* y *L. plantarum*



VI. DISCUSIÓN

Actualmente se investigan numerosas cepas de *Lactobacillus* con la finalidad de encontrar potenciales probióticos que puedan ser empleadas en la salud oral.

En la mayoría de los estudios, las cepas de *Lactobacillus* se aíslan directamente de la cavidad oral, del tracto gastrointestinal o se obtiene de forma pura en casas comerciales o en productos lácteos. El presente estudio trabajó con la cepa comercial *Lactobacillus reuteri* Protectis DSM 17938 de la empresa BioGaia.

El presente estudio experimental fue diseñado para poder aportar datos acerca del efecto inhibitor de la cepa comercial *L. reuteri* sobre el crecimiento *in vitro* de BNP. Asimismo, también se evaluó la sensibilidad de BNP frente a la cepa productora de sustancias antimicrobianas *L. plantarum* E2 como control positivo.

Diferentes cepas de *Lactobacillus* han sido estudiadas por investigadores como Teanpaisan¹⁷, Koll^{22, 79} y Samot¹⁵ que evaluaron el efecto de diferentes especies de *Lactobacillus* orales sobre patógenos Gram positivos y Gram negativos de la cavidad bucal, concluyendo que *Lactobacillus* puede ser de beneficio como probióticos para la prevención de enfermedades orales.

La mayoría de los estudios han reportado una actividad inhibitoria de *Lactobacillus* contra *S. mutans* y pocos han demostrado la supresión de crecimiento de patógenos periodontales. Ishikawa⁸² evaluó la inhibición de BNP *in vitro* como de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. nigrescens* por *L. salivarius*. En sus resultados se observó reducción de los recuentos salivales de estos anaerobios negro-pigmentados mientras que en nuestro estudio solo *L. plantarum* muestra inhibición de crecimiento sobre estos patógenos.

Lactobacillus reuteri es un agente probiótico, usado ampliamente en enfermedades gastrointestinales, pero pocos estudios disponibles sobre su rol en la cavidad bucal.

Estudios *in vivo* como el de Teughels¹⁰, Vivekananda¹⁸ evaluaron los efectos del probiótico *L. reuteri* como complemento al raspado y alisado radicular en pacientes con periodontitis crónica y observaron la reducción significativa de los parámetros clínicos y la presencia de patógenos periodontales como *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*.

Kang¹⁶ evaluó los efectos de *L. reuteri* sobre bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas de la cavidad bucal, atribuyéndose la actividad antibacteriana de *L. reuteri* a la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Asimismo, Baca⁹ evaluó la actividad antimicrobiana de *L. reuteri* sobre bacterias patógenas que intervienen en la formación de caries dental *S. mutans*, *S. gordonii*; así como en la enfermedad periodontal *A. naeslundii* y *T. forsythia*. En sus resultados Kang¹⁶ y Baca⁹ observaron que *Lactobacillus reuteri* mostró efectos inhibitorios sobre el crecimiento de bacterias patógenas. En nuestros resultados no observamos inhibición sobre el crecimiento de BNP.

En cuanto a la actividad antibacteriana de *Lactobacillus*, koll⁷⁹ mediante el método Líneas de rayas, determinó inhibición de crecimiento de *P. gingivalis* y *P. intermedia* por *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius*; resultados similares a las investigaciones realizadas por Teanpaisan¹⁷, Samot¹⁵ quienes determinaron que diferentes especies de *Lactobacillus* mostraron inhibición de crecimiento sobre patógenos Gram negativos de la cavidad bucal. El presente estudio evaluó la sensibilidad de BNP mediante el método de doble capa en agar.

Hammad⁸⁶ evaluó el efecto de *L. reuteri* DSM 17938 en la terapia endodóntica, específicamente contra *Enterococcus faecalis*. El método empleado fue doble

capa en agar, la misma cepa y el mismo método que se emplearon en el presente estudio. En sus resultados no observó inhibición de crecimiento sobre la bacteria patógena, resultado similar a nuestro estudio.

La reuterina es un potente antimicrobiano liberado por *L. reuteri* en presencia de glicerol y bajo condiciones anaeróbicas. Hedberg²⁰ evaluó el efecto de *L. reuteri* con y sin glicerol. En sus resultados observó la inhibición en los medios de cultivo sembrados con glicerol sobre patógenos periodontales atribuyendo este efecto a reuterina. En el presente estudio no se pudo valorar el efecto de la reuterina debido a que los medios de cultivo no contenían glicerol.

La actividad antibacteriana de las cepas de *Lactobacillus* depende de diversos factores, entre los que destacan la fuente de obtención de la cepa, los medios de cultivo, temperatura, pH, condiciones atmosféricas, el tiempo, el método para la prueba de antagonismo, dichos factores pueden intervenir en la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas de la bacteria ácido láctica.

VII. CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones de este estudio, se concluye que las sustancias producidas por *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 no ejercieron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de Bacilos Negro Pigmentantes. Por el contrario, sí se observó inhibición del crecimiento de BNP frente a las sustancias producidas por la cepa referencial usada como control positivo *Lactobacillus plantarum* E2.

En el presente trabajo, también se observó susceptibilidad de *Lactobacillus fermentum* CHJ4C frente a las sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus reuteri* DSM17938.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios *in vitro* que determinen el efecto inhibidor de otro tipo de bacterias probióticas del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* aislados de la cavidad bucal o de otras fuentes naturales frente a patógenos orales.
- Realizar más estudios *in vitro* del efecto de *L. reuteri* frente a patógenos Gram positivos de la cavidad bucal, además considerar el uso de glicerol en condiciones de anaerobiosis para la secreción de reuterina y su posible efecto inhibidor frente a patógenos periodontales.
- Ampliar estudios enfocados al manejo de bacterias lácticas, determinando su estudio cinético de crecimiento e identificando sus principales bacteriocinas.
- Realizar más estudios *in vitro* e *in vivo* que evalúen el comportamiento de la cepa probiótica *L. plantarum* E2 en la cavidad oral.
- Trabajar las cepas de *Lactobacillus* en condiciones de temperatura, pH, condiciones atmosféricas similares en la cavidad oral.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fontana L, Bermudez M. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. Br J Nutr 2013; 35-50.
2. Stamatova I, Meurman J. Probiotics: Health benefits in the mouth. Americ J Dent 2009; 22(6): 329-338.
3. Raff A. Probiotics for periodontal Health: a review of the literatura. J Dent Hyg 2012; 86(2): 71-81
4. Sinkiewicz G, Cronholm S. Influence of dietary supplementation with *Lactobacillus reuteri* on the oral flora of healthy subjects. Swed Dent J 2010; 34(4): 197-206.
5. Haffajee, AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5; 78-111.
6. Connolly E. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730: a clinically proven probiotic. Nutrafoods 2004; 3(1): 15-22.
7. Ministerio de salud del Perú. Salud bucal http://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevención_2asp?sub5=13.
8. Peña S. La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. Rev Cubana Estomatol 2008; 45(1): 1-9.
9. Baca-Castañon M. Antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* on cariogenic bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* and periodontal diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. Probiotics and Antimicro Prot 2005; 7(1): 1-8.
10. Teughels W, Durukan A. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. J Clin Periodontol 2013; 40 (11): 1025-1035.

11. Hallstrom H, Lindgren S. Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. *Acta Odontol Scand* 2013; 71: 828-833.
12. Szkaradkiewicz A, Stopa J. Effect of oral administration involving a probiotic strain of *Lactobacillus reuteri* on pro-inflammatory cytokine response in patients with chronic periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp* 2014; 62(6): 495-500.
13. Vicario M, Santo A. Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontol Scand* 2013; 71(4): 813-819.
14. Keller M, Bardow A. Effects of chewing gums containing the probiotic *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontol Scand* 2012; 70 (3): 246-250.
15. Samot J, Badet C. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral Health. *Anaerobe* 2013; 19: 34-38.
16. Kang M. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol* 2011; 49(2): 193-199.
17. Teanpaisan R. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol* 2011; 53(4): 452-459.
18. Vivekananda M, Vandana K. Effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. *J Oral Microbiol* 2010; 2: 1-9.
19. Twetman S. Short-term effect of chewing gums containing probiotics *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand* 2009; 67: 19-24.
20. Hedberg, M. *In vitro* growth inhibition of periodontitis associated species by *Lactobacillus reuteri*. Umeå University 2006.
21. Mayanagui G, Kimura M. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 506-513.

22. Koll, P. Characterization of oral Lactobacilli as potential probiotics for oral Health. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23(2): 139-147.
23. Amores R, Calvo A. Probióticos. *Rev Esp Quimioterap* 2004; 17(2): 131-139.
24. Sanders M. Probiotics: considerations for human Health. *Nutr Rev* 2003; 61(3): 91-99.
25. Lopez M, Domingo D. Antibioticoterapia con probióticos. *Rev Esp Quimioterap* 2007; 20(2): 170-181.
26. Samaniego L, Sosa Del Castillo M. *Lactobacillus* spp. importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. 2000.
27. Sinkiewicz G. *Lactobacillus reuteri* in health and disease. Health and Society Doctorals Dissertations 2010
28. Spinler J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14:166-171.
29. Arskold E, Lohmeier-Vogel E. Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J Bacteriol* 2008; 190(1): 206-212.
30. Talarico T. Utilization of glicerol as a Hydrogen acceptor by *L. reuteri*: Purification of 1,3 propanodiol: NAD⁺ oxidoreductase. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(4): 943-948.
31. Chung T, Axelsson L. *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Healt and Disease* 1989; 2: 137-144.
32. Talarico T. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 1988; 32(12): 1854-1858.
33. Doleyres Y. Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68: 467-474.

34. Lüthi-Peng Q. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 60: 73-80.
35. Lüthi-Peng Q. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59: 289-296.
36. Roos S, Jonsson H. A high molecular mass cell surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 2002; 148(2): 433-442.
37. Walter J, Schwab C. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* 2008; 154(1): 72-80.
38. Kralj S, Stripling E. Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7): 3942-3950
39. Jones S, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*. 2009; 9(35): 1-9.
40. Sanders M. An update on the use and investigation of probiotics in Health and disease. *Gut* 2013; 62: 787-796.
41. Salisu S. Potentials of probiotics as alternative therapy in combating bacterial diseases: a review. *British Journal of Applied Science and Technology* 2014; 4(9): 1392-1410.
42. Toiviainen A. Probiotics and oral Health: *in vitro* and clinical studies. *Annales Universitatis Turkuensis*. 2015.
43. Jain P, Sharma P. Probiotics and their efficacy in improving oral Health: A review. 2012.
44. Saha S, Tomaro C. Probiotics as oral Health biotherapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(9): 1207-1220.

45. Bhardwaj A. Role of probiotics in dental caries and periodontal disease. Arch of Clin and Experiment Surgery. 2012; 1(1): 45-49.
46. Hasloff P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic Lactobacillus. An *in vitro* study. BMC Oral Health 2010; 10(18): 1-6.
47. Rebolledo M, Rojas E, Salgado F. Efecto de dos probióticos que contienen cepas de *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus y *Lactobacillus johnsonii* sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. Int J Odontostomat 2013; 7(3): 415-419.
48. Iniesta M, Zurbriggen M. Los probióticos y sus beneficios terapéuticos. Rev Soc Esp Periodon Osteoint 2011; 21(3):171-179.
49. Hatakka K, Ahola A. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly-a randomized controlled trial. J Dent Res 2007; 86: 125-130.
50. Li D, Li Q. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of Candida-associated stomatitis. Mycoses 2014; 57: 141-146.
51. Barrios G, Caffesse R. Odontología, Editar Ltda., Colombia 2004.
52. Bascones M, Figuero R. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Av Periodon Implantol 2005; 17 (3): 147-156.
53. Matezans P, Matos R. Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura. Av Periodon Implantol 2008; 20(1): 11-25.
54. Escudero N, Perea M. Revisión de la Periodontitis Crónica: Evolución y su aplicación clínica. Av Periodon Implantol. 2008; 20(1): 27-37.
55. Botero J, Bedoya E. Determinantes del diagnóstico periodontal. Rev Clin Period Implantol Rehab Oral 2010; 3(2): 94-99
56. Bravo M, Casals E. Encuesta de salud oral en España 2005. Rcoe 2006; 11(4): 409-456.

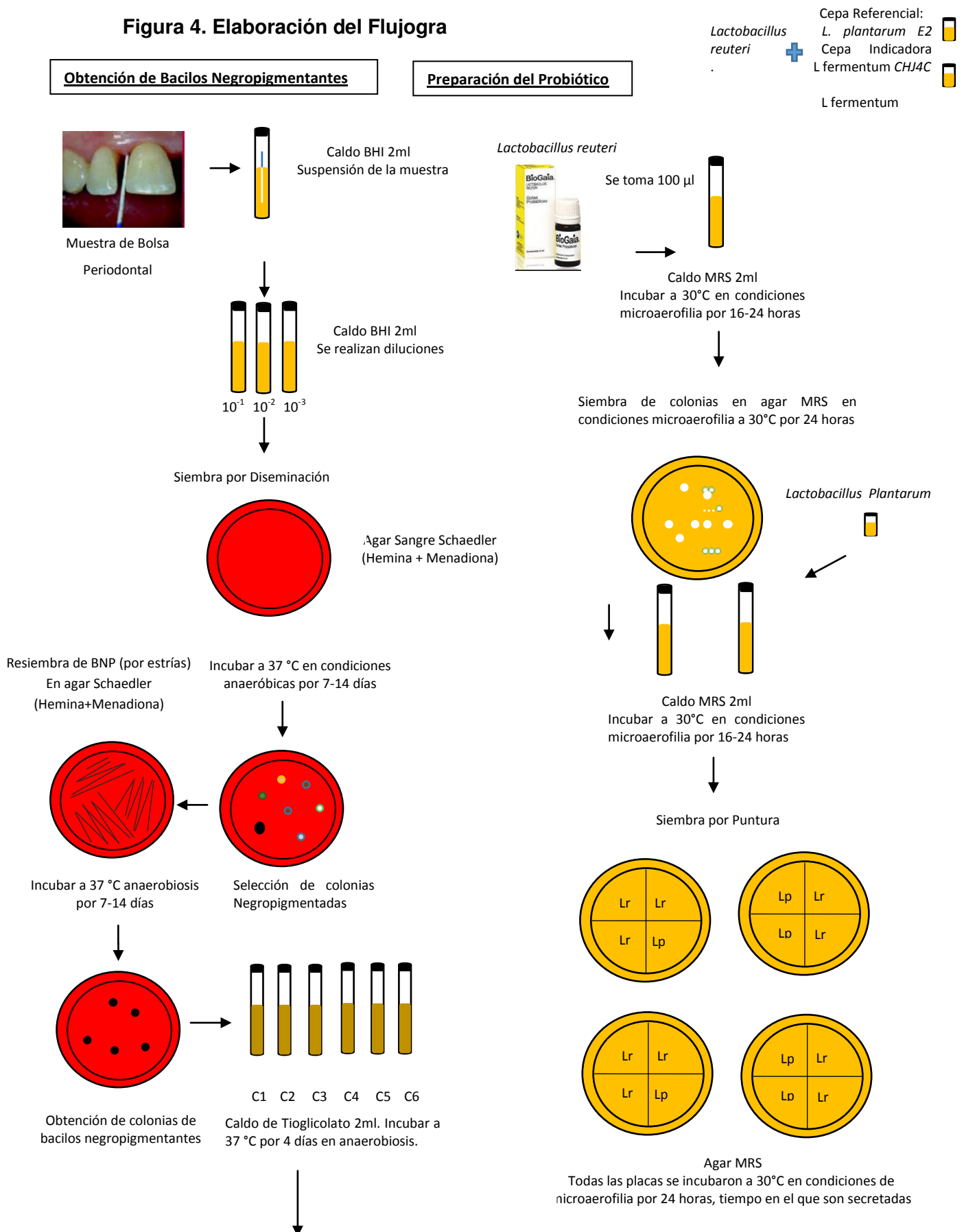
57. Gamonal J, Mendoza C. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National dental examination survey. J Periodontol. 2010; 81(10): 1403-1410.
58. Romanelli H. Periodontal treatment needs in Argentine adult subjects. Acta Odontol Latam 2007; 20(1): 39-47.
59. Otero J. Prevalencia de enfermedades periodontales, factores de riesgo y necesidad de tratamiento en el personal de tropa masculino en Servicio Militar en Lima en el año 2000. Rev Estomatol Herediana 2005; 15(1): 11-17.
60. Szkaradkiewicz A, Karpinski T. Microbiology of chronic periodontitis. J Biol Earth Sci 2013; 3(1): 14-20.
61. Guilarte C y Perrone M. Bacterias periodontopatógenas: Bacilos anaerobios Gram negativos como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal. Acta Odontol Venez 2005; 43(2): 198-204.
62. Iniesta M, Herrera D, Serrano J, Sanz M. Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromona gingivalis* y *Tannerella forsythia*. Rev Soc Esp Period Osteint 2008; 18(2): 109-115
63. Medina A, Montoya A. Perfil microbiológico subgingival de pacientes con periodontitis crónica en una población de Colombia. Av Periodon Implantol. 2012; 24(1): 47-53.
64. Troncoso M, Castillo-Ruiz M. Co-detección de patógenos periodontales en pacientes chilenos con periodontitis crónica. Rev Clin Period Implantol y Reh Oral. 2010; 3(3): 118-122.
65. Guillarte C, Perrone M. Detección de especies de bacilos anaerobios Gram negativos en pacientes con periodontitis crónica. Acta Odontológica Venezolana. 2007; 45(1): 6-13.

66. Ramos D, Moromi H, Martínez E. *Porphyromona gingivalis*: patógeno predominante en la Periodontitis Crónica. Odontol Sanmarq 2011; 14(1): 34-38.
67. Díaz J, Yáñez J. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. Rev Clin Period Implantol Rehabil Oral 2012; 5(1): 40-45.
68. Avila Torres Yeimy. Aislamiento e identificación de *Porphyromona gingivalis* y *Prevotella intermedia* en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica. 2012.
69. Stamatova I, Meurman J. Probiotics and periodontal disease. Periodontology 2000. 2009; 51(1): 141-151.
70. Gupta, G. Probiotics and periodontal health. Journal of medicine and life. 2011; 4(4): 387-394.
71. Sugano N. Biological plaque control: novel therapeutic approach to periodontal diseases. Journal of oral Science 2012; 54(1): 1-5.
72. Koduganti R, Sandeep N. Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. Ind J Dent Res 2011; 22(2): 324-330.
73. Iniesta M, Montero E, Zurbriggen M, Herrera D. El control del biofilm y los probióticos. Rev Soc Esp Periodon Osteoint 2012; 22(4): 273-280.
74. Shivakumar V. Probiotics in Periodontology. Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry 2011; 1(6): 315-320.
75. Haukioja, Anna. Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in the mouth—in vitro studies on saliva-mediated functions and acid production. 2009.
76. Ince, G, Gürsoy, H. Clinical and biochemical evaluation of lozenges containing *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis. J Periodontol. 2015; 86(6): 746-754.
77. Della Riccia, D. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. Oral Diseases. 2007; 13(4): 376-385.

78. Kawai, T. Determination of the Antibacterial Constituents Produced by Lactobacilli against a Periodontal Pathogen: Sodium Lactate and a Low Molecular Weight Substance. J Prob Health. 2016. 4(1359): 1-7.
79. Koll-Klais P, Mandar R. Oral Lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal Health: species composition and antimicrobial activity. Oral Mircob Immunol 2005; 20: 354-361.
80. Pangsomboon, K, Kaewnopparat S. Antibacterial activity of a bacteriocin from Lactobacillus paracasei HL32 against Porphyromonas gingivalis. Archives of oral biology. 2006; 51(9): 784-793.
81. Khalaf, H, Nakka, S, Sandén, C. Antibacterial effects of lactobacillus and bacteriocin NC8 $\alpha\beta$ on the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. BMC Microbiology. 2016; 16(188): 1-11.
82. Ishikawa. H, Aiba Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI 2711. J Japan Society of Periodontol. 2003; 45(1): 105-112.
83. Wikilengua del español. Terminesp: actividad antibacteriana.http://www.wikilengua.org/index.php/Terminesp:actividad_antimicrobiana
84. Quillama E. Producción de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora. Tesis para optar el grado académico de Magister en Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima. 1998.
85. Cruz, L. Caracterización probiótica de una cepa nativa de Enterococcus faecium QPa.1 aislada de queso de elaboración artesanal. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima. 2011.
86. Hammad. Probiotic use in Endodontic therapy. Thesis for the degree of Master of Science in Oral Science. University of Illinois Chicago. 2013.

X. ANEXOS

Figura 4. Elaboración del Flujogra



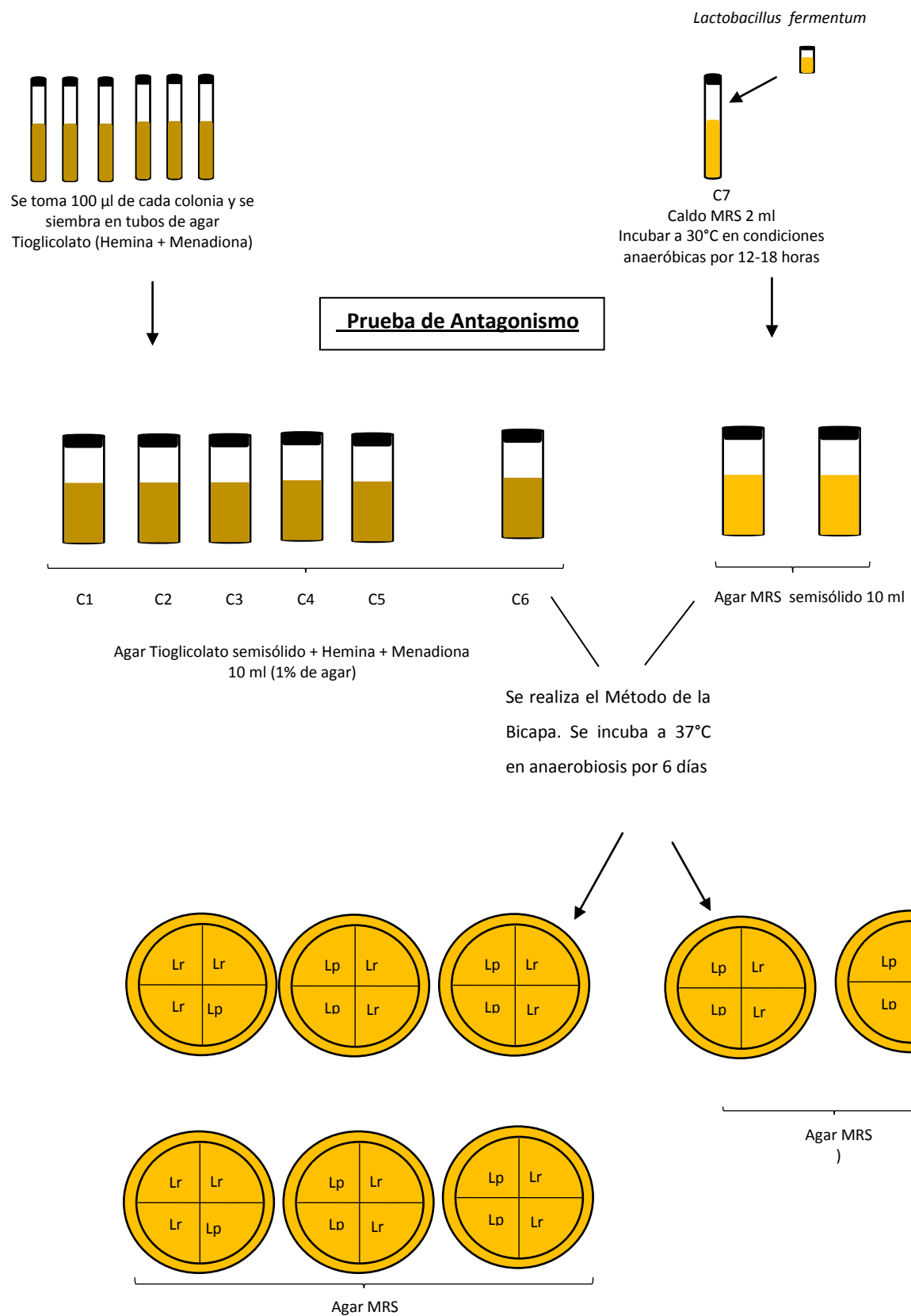


Figura 5. Ficha de recolección de datos.

Prueba de Sensibilidad													
	BNP (Halos de Inhibición en mm)										<i>L. fermentum</i> (Halos de inhibición en mm)		
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P1	P2	P3
<i>L. reuteri</i>													
<i>L. plantarum</i>													

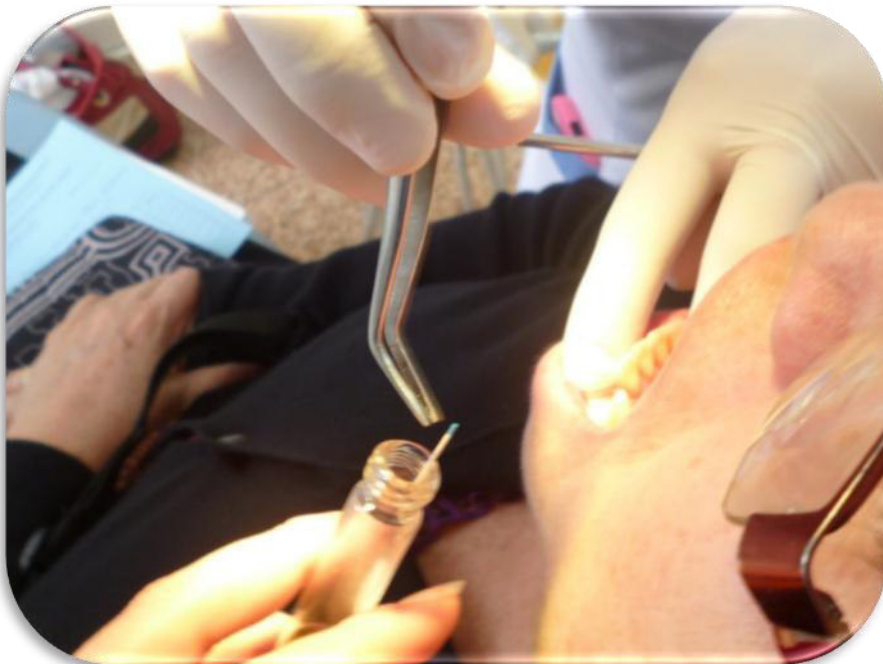
Fuente: Elaboración propia

Fotografías

1. Aislamiento de pieza dentaria



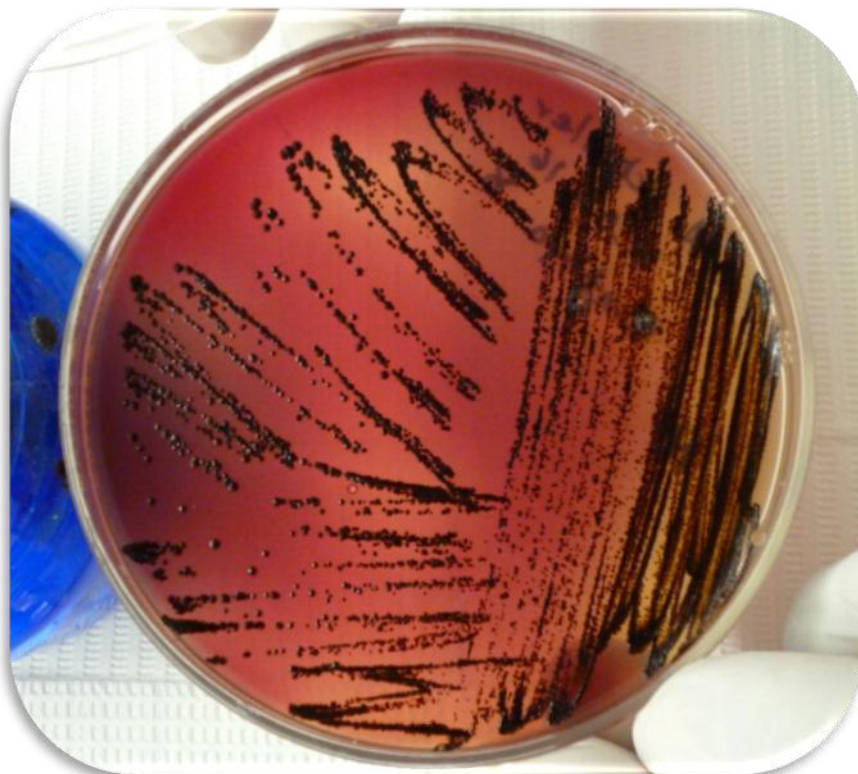
2. Toma de muestra con conos de papel



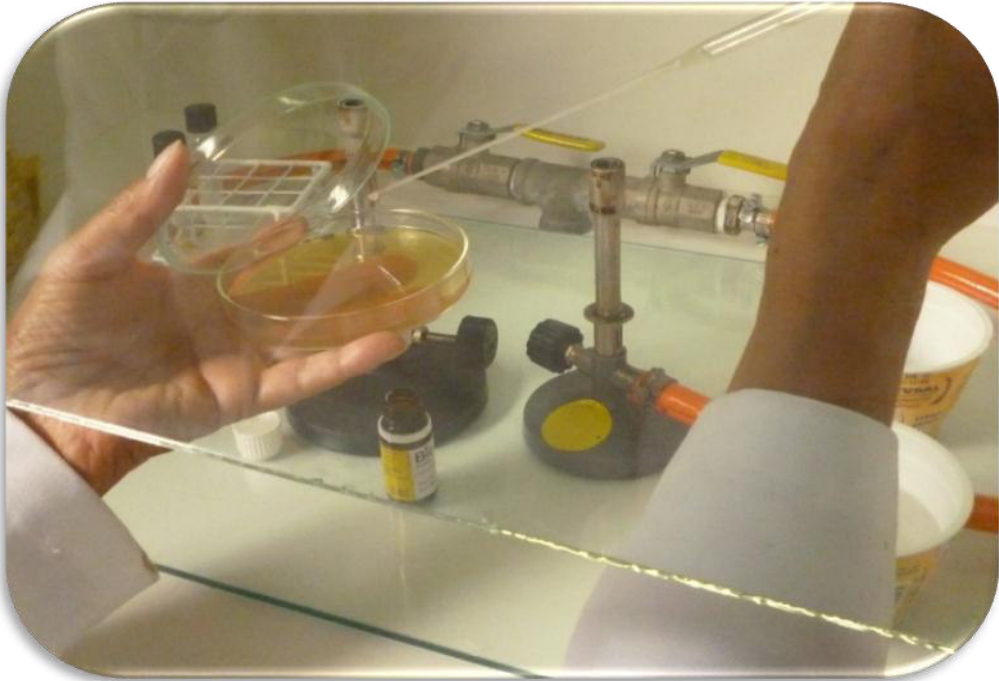
3. Cultivo de flora mixta de bolsa periodontal



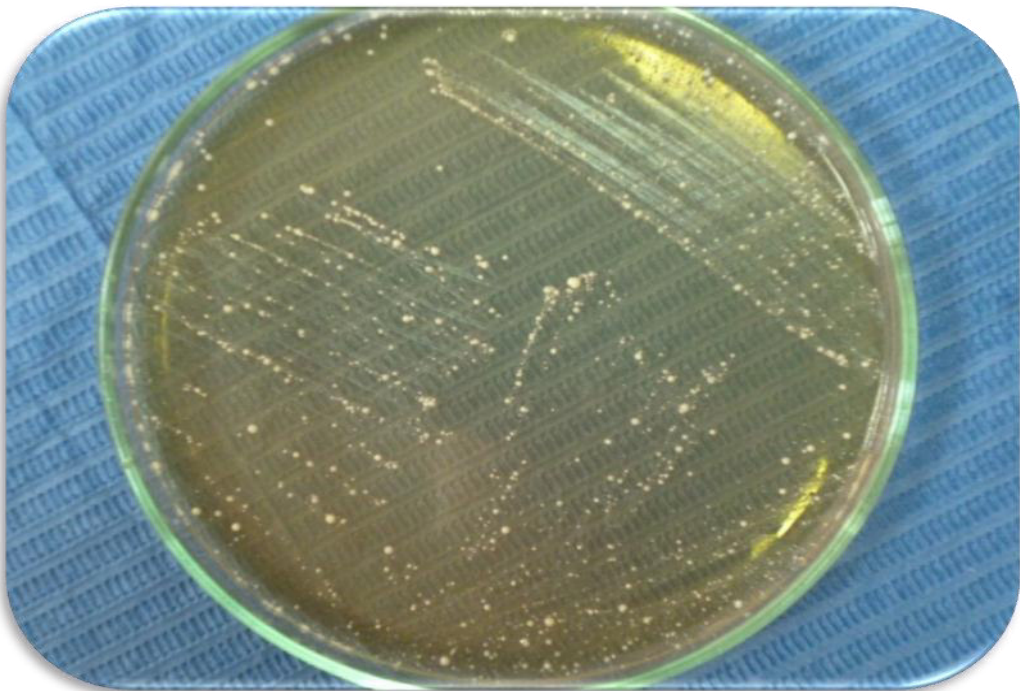
4. Cultivo de Bacterias Negro Pigmentantes



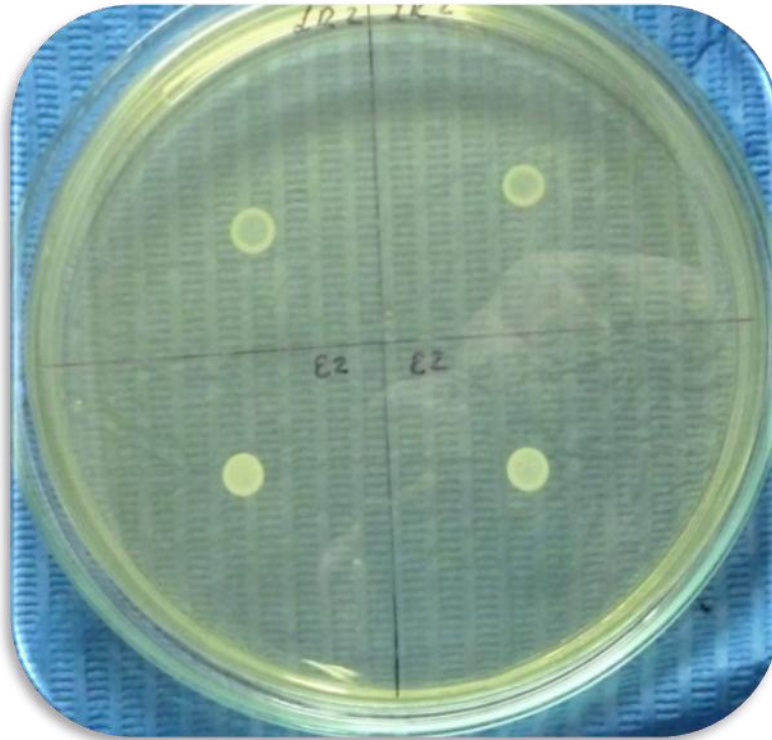
5. Aislamiento de *Lactobacillus reuteri*



6. Cultivo de *Lactobacillus reuteri* en agar MRS



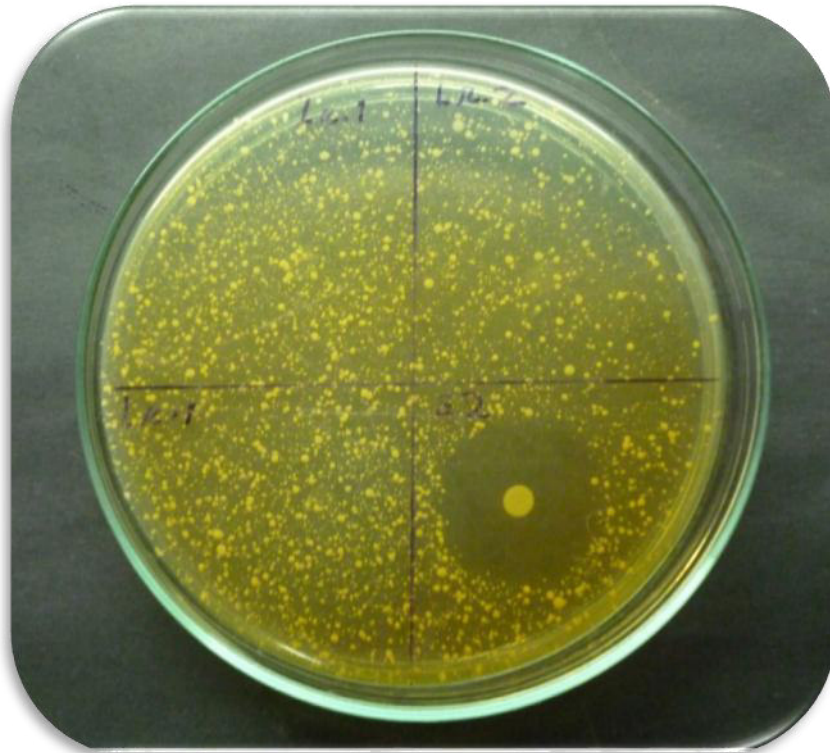
7. Crecimiento de *L. reuteri* y *L. plantarum* a las 24 horas



8. Prueba de Antagonismo



9. Sensibilidad de BNP frente a *L. reuteri* y *L. plantarum*



10. Sensibilidad de *L. fermentum* contra *L. reuteri* y *L. plantarum*

